

VIP

¹²⁵I RIA Kit

For the quantitative determination of vasoactive
intestinal peptide (VIP) in plasma

Instruction Manual

Manuel d'Instructions

Testanleitung

Manuale di Istruzioni

Manual de instruções

**Catalog No./REF./KAT.-NR./Numero di Catalogo/
Nº de Catálogo: 39125**

DiaSorin

Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.

TABLE OF CONTENTS

English Page 1

Français 13

Deutsch 25

Italiano.....38

Português.....50

VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE (VIP) RADIOIMMUNOASSAY

1. INTENDED USE

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE

This kit is intended for the quantitative determination of vasoactive intestinal peptide (VIP) in plasma by radioimmunoassay (RIA).

2. SUMMARY AND EXPLANATION

VIP is a 28 amino acid compound originally extracted from the small intestine of the pig.^{1,2} Its amino acid sequence, compared to several related peptides, is as follows:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
VIP	His-	Ser-	Asp-	Ala-	Val-	Phe-	Thr-	Asp-	Asn-	Tyr-	Tyr-	Arg-	Leu-	Arg
Secretin	His-	Ser-	Asp-	Gly-	Thr-	Phe-	Thr-	Ser-	Glu-	Leu-	Ser-	Arg-	Leu-	Arg
Glucagon	His-	Ser-	Gln-	Gly-	Thr-	Phe-	Thr-	Ser-	Asp-	Tyr-	Ser-	Lys-	Tyr-	Leu
GIP	Tyr-	Ala-	Gln-	Gly-	Thr-	Phe-	Ile-	Ser-	Asp-	Tyr-	Ser-	Lys-	Ala-	Met

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
VIP	Lys-	Gln-	Met-	Ala-	Val-	Lys-	Lys-	Tyr-	Leu-	Asn-	Ser-	Ile-	Leu-	Asn (NH ₂)
Secretin	Asp-	Ser-	Ala-	Arg-	Leu-	Gln-	Asp-	Leu-	Leu-	Gln-	Gly-	Leu-	Val	(NH ₂)
Glucagon	Asp-	Ser-	Arg-	Arg-	Ala-	Gln-	Asp-	Phe-	Val-	Gln-	Trp-	Leu-	Met-	Asn-Thr
GIP	Asp-	Lys-	Ile-	Arg-	Gln-	Gln-	Asp-	Phe-	Val-	Asn-	Trp-	Leu-	Leu-	Ala-etc.

There are similarities between the amino-terminal region of VIP and the amino-terminal regions of secretin, glucagon, and gastric inhibitory polypeptide (GIP). The carboxy-terminal region (i.e., residues 15-28), however, is quite different.

VIP has widespread occurrence throughout the gastrointestinal tract, where Bloom and Polak find tissue concentrations of VIP to be higher than any other gut peptide.³ Peripheral effects of VIP in the gut include: increased alkaline juice flow from the pancreas¹ inhibition of gastric acid production^{4,5} stimulation of insulin release⁶ hyperglycemia as a result of glycogenolysis⁷ stimulation of small intestinal juice flow and increased cyclic adenosine monophosphate (cAMP) content of the intestine.^{8,9}

VIP is also found in high concentration throughout the central nervous system, where it has strong vasodilator and hypotensive effects on the cardiovascular system, and in the respiratory system where it influences bronchodilation and augments ventilation.¹⁰ VIP is located in both neurons and endocrine cells, although more predominantly in the former, and appears to be released through neuronal stimulation.¹⁰⁻¹⁴

VIP measurement is used to research certain types of pancreatic islet tumors which secrete excessive amounts of the peptide. This condition has been designated as the Verner-Morrison syndrome,¹⁵ and is characterized by refractory watery diarrhea, hypokalemia, and achlorhydria (WDHA syndrome). Individuals with this syndrome have greatly elevated plasma VIP levels, often thousands of times the normal concentration.¹⁶⁻¹⁸ Another form of diarrhea, which manifests symptoms very similar to those of the Verner-Morrison syndrome, is the result of islet hyperplasia. Unlike the Verner-Morrison syndrome, however, this condition is characterized by normal VIP levels; these cases have been designated by Bloom and Polak as the pseudo-Verner-Morrison syndrome.^{3,19} Tumors other than those of the islet which produce elevated VIP levels include: ganglioneuroblastoma, bronchiogenic carcinoma, pheochromocytoma, medullary thyroid carcinoma, and retroperitoneal histiocytoma.^{15,21-23}

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

VIP is measured by a radioimmunoassay using delayed tracer addition to increase sensitivity. Sample and rabbit anti-VIP are added, followed by a 24 hour incubation at 2-8°C. ¹²⁵I VIP is then added, followed by a second incubation for 24 hours at 2-8°C. Pre-precipitated carrier, second antibody, and polyethylene glycol are added in a single step. The assay can be centrifuged and decanted after a minimum of 2 hours incubation at 2-8°C.

4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

VIP Citrate Buffer	1 vial/2 mL
VIP Calibrator 0	1 vial/5 mL
VIP Calibrators (0-5)	5 vials/2 mL
VIP Antiserum	1 vial/12.5 mL
¹²⁵ I VIP	1 vial/12.5 mL
Precipitating Complex (GAR-PPT)	1 vial/35 mL
VIP Controls (Level 1 and 2)	2 vials/2 mL
Number of tests	125

STORAGE: Upon receipt, and prior to reconstitution, store all reagents at 2-8°C. After reconstitution store all reagents at -15° or lower until the expiration date on the label. Reagents should not be used past the expiration date.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming. Reagents from different batches must not be mixed.

4.1 VIP Citrate Buffer: lyophilized reagent

BSA-citrate buffer contains thimerosal as a preservative. Reconstitute the vial with 2 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.2 VIP Calibrator 0: lyophilized reagent

Citrated plasma is diluted in BSA-citrate buffer containing thimerosal and other stabilizers. Reconstitute the vial with 5 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.3 VIP Calibrators: lyophilized reagent

VIP calibrators, at nominal concentrations ranging from 25-400 pg/mL, are prediluted in VIP-free plasma and BSA-citrate buffer. Exact concentration values are assigned according to each lot. Reconstitute each vial with 2.0 mL of purified water, mix and allow them to stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using. This kit is standardized with Synthetic VIP. The calibrator demonstrates commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this *in vitro* diagnostic test as recommended.

4.4 VIP Antiserum: lyophilized reagent

Rabbit anti-VIP serum is diluted in BSA-borate buffer containing thimerosal. Reconstitute the vial with 12.5 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.5 ¹²⁵I VIP: lyophilized reagent

VIP is labeled with iodine-125 and diluted in BSA-citrate-EDTA buffer containing thimerosal and other stabilizers. Reconstitute the vial with 12.5 mL of purified water, mix and allow it to stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.6 Precipitating Complex (GAR-PPT): lyophilized reagent

Normal rabbit serum, pre-precipitated with goat anti-rabbit serum and polyethylene glycol (PEG), is diluted in BSA-borate buffer containing thimerosal and other preservatives. Reconstitute each vial with 35 mL of purified water; mix thoroughly until the suspension appears homogeneous and then allow it to stand for a minimum of 30 minutes at room temperature with occasional mixing.

4.7 VIP Control (level 1 and level 2): lyophilized reagent

Defibrinated human plasma is spiked, if necessary, with the appropriate amount of VIP to obtain a concentration within a specified range. Sodium azide is added as a preservative. Reconstitute each vial with 2.0 mL of purified water, mix and allow them to stand for 15-20 minutes until the contents are completely dissolved.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE ONLY.

Not for internal or external use in humans or animals.

REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL

Treat as potentially infectious.

Each serum/plasma donor unit used in the preparation of this product has been tested by a U.S. FDA approved method and found non-reactive for the presence of HBsAg, antibody to HCV, and antibody to HIV 1/2. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected units will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV), or other infectious agents are absent, all products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions as described in the U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4th ed., May 1999 or current edition.

REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE

CAUTION: Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

REAGENTS CONTAINING THIMEROSAL

Some reagents in this kit contain thimerosal which contains a mercury compound. Disposal of elemental mercury, inorganic mercury, mercury oxides, and mercury compounds should be done in strict compliance with all local, state, and federal regulations.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause birth defects or other reproductive harm.

REAGENTS CONTAINING IODINE-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 2 μ Ci (74 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed, and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use, and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.

5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer, and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

6. INDICATIONS OF POSSIBLE DETERIORATION OF KIT REAGENTS

- 6.1 The presence of abnormal particulate matter in any of the reagents.
- 6.2 A shift in the slope or position of the calibrator curve from what is normally obtained.
- 6.3 A decrease in maximum binding.
- 6.4 A high nonspecific binding.

7. COLLECTION AND PREPARATION OF SPECIMEN

Two hundred microliters in duplicate, of EDTA plasma containing Aprotinin, are required for the VIP assay. Plasma samples may be assayed directly, with no extraction required.

The use of plasma containing EDTA and Aprotinin is necessary in the initial sample collection for VIP.

Collect blood in a 5 mL or 10 mL evacuated glass tube using EDTA as an anticoagulant. Aprotinin should be added immediately to the collection tube to prevent degradation of the VIP in the specimen at a concentration of 2,500 KIU/5 mL of whole blood. Immediately centrifuge the samples for 15 minutes at $760 \times g^{**}$ to obtain hemolysis-free plasma. Separate the serum from the cells and place in storage tubes. If the specimen is not used immediately, store it at -15°C or lower. Specimens should not be repeatedly frozen and thawed.

All plastics, glassware or other materials coming into contact with the specimen should be entirely free of any contamination.

8. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

- 8.1 Disposable borosilicate glass tubes, 12 x 75 mm.
- 8.2 Temperature controlled centrifuge to accommodate 12 x 75 mm tubes.
- 8.3 Gamma scintillation counter capable of counting iodine-125.
- 8.4 Vortex.
- 8.5 Suggested pipetting devices:
 - a. Micropipettors calibrated to deliver 100 μL and 200 μL .
 - b. Repeating dispensers calibrated to deliver 100 μL , 500 μL , and 1 mL.
- 8.6 0.85% saline.
- 8.7 Purified water.

9. ASSAY PROCEDURE

CAUTION: SET UP ASSAY ON **CRUSHED ICE**. VIP IS LABILE IN PLASMA STORED AT ROOM TEMPERATURE; THEREFORE, THIS PRECAUTION IS NECESSARY TO OBTAIN VALID RESULTS.

- 9.1 Reconstitute lyophilized reagents and allow any frozen reagents to thaw completely. Do not allow reagents to reach temperatures above 25°C . Gently mix all reagents before using.

$$^{**} g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

- 9.2 Set up labeled 12 x 75 mm disposable glass tubes in duplicate according to the Scheme of the Assay, on the back page.
- 9.3 Add reagents as follows:
 - a. **Total count tubes**
Set aside until step 5
 - b. **Nonspecific binding tubes (NSB)**
200 μ L of Calibrator 0
100 μ L of VIP citrate buffer
 - c. **Calibrator 0**
200 μ L of Calibrator 0
100 μ L of VIP antiserum
 - d. **VIP calibrators (A-E)**
200 μ L of VIP calibrator
100 μ L of VIP antiserum
 - e. **Controls and unknown samples**
200 μ L of plasma
100 μ L of VIP antiserum
- 9.4 Vortex the tubes gently without foaming and incubate them for 24 hours (± 2 hours) at 2-8°C.
- 9.5 Add 100 μ L of 125I VIP to all tubes.
- 9.6 Vortex the tubes gently without foaming and incubate them for 24 hours (± 2 hours) at 2-8°C.
- 9.7 Add 1 mL of 0.85% saline to all tubes except the total count tubes.
- 9.8 Vigorously mix the GAR-PPT; add 500 μ L to all tubes except the total count tubes.
- 9.9 Vortex the tubes gently without foaming and incubate them for 2 hours (± 15 minutes) at 2-8°C.
- 9.10 Centrifuge the tubes using 760 x g* for 20 minutes at 20-25°C.
- 9.11 Immediately decant the supernatant from all the tubes except the total count tubes by inverting them for a minimum time of 2 minutes. Blot the tubes on absorbent paper to remove any drops of supernatant that may be remaining on the rims before turning the tubes upright.
- 9.12 Using a gamma scintillation counter, count the precipitate of each tube and the total count tubes for 60 seconds or longer. (See Limitations of the Procedure section).

10. PROCEDURAL COMMENTS

- 10.1 Assay all samples in duplicate to ensure confidence in values obtained.
- 10.2 Add each aliquot of reagent to the lower third of assay tube to ensure complete mixture of reagents.
- 10.3 Some manufacturers' disposable tubes yield elevated nonspecific bindings.
- 10.4 If you choose to aspirate the supernatant from the precipitate, be careful not to disturb the precipitate.
- 10.5 Any value greater than the highest calibrator must be diluted with calibrator 0 and assayed again. Correct result using the appropriate dilution factor.
- 10.6 When performing the centrifugation step, the temperature must be controlled so that it does not exceed 25°C.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

10.7 To completely monitor the consistent performance of an RIA there are additional factors which may be checked. DiaSorin suggests a check of the following parameters to assure consistent kit performance.

a. Total Counts

b. Maximum Binding

Average counts per minute (CPM) of calibrator 0 Tubes/Average CPM of Total Count Tubes.

c. Nonspecific Binding

Average CPM of NSB Tubes/Average CPM of Total Count Tubes.

d. Slope of Calibrator Curve

For example, monitor the 80, 50 and 20% suppression points of the calibrator line.

11. QUALITY CONTROL

Each laboratory should include at least two kit controls in every assay to ensure the validity of each assay's results. A mean and standard deviation should then be determined for each control using a minimum of ten assays. An acceptable range of values may then be obtained for these controls using ± 2 standard deviations of the values previously determined. The DiaSorin Quality Control Laboratory has determined a range for the controls included with this kit. These ranges are printed on the quality control vials.

12. CALCULATION OF RESULTS

There are many methods in existence for calculating results of RIAs. Each is based on obtaining a calibration curve by plotting the extent of binding against stated concentrations of the calibration calibrators. This graph may be either a linear or logarithmic scale. Each of these methods gives essentially the same values for controls and samples, although certain assays may "fit" better into one particular method versus another. The calculation method for the DiaSorin Quality Control Laboratory is $\%B/B_0$ versus log concentration.

12.1 Calculate the average CPM for each calibrator, control and unknown sample.

12.2 Subtract the average CPM of the NSB tubes from all counts.

12.3 Divide the corrected CPM of each calibrator, control, or sample by the corrected CPM of the calibrator 0.

$$\frac{\text{CPM of Calibrator or Unknown Sample} - \text{CPM of NSB}}{\text{CPM of Calibrator 0} - \text{CPM of NSB}} \times 100$$

12.4 Using two cycle semi-log or log-logit graph paper, plot percent B/B_0 for the VIP calibrators (vertical axis) versus the concentration (horizontal axis).

12.5 Draw a best fit line through the points.

12.6 Interpolate the levels of VIP in the unknown samples from the plot.

12.7 If an unknown sample has been diluted, correct for the appropriate dilution factor.

12.8 Calculate maximum binding by dividing CPM of calibrator 0 by the average total counts obtained in the total count tubes.

TABLE III
DiaSorin VIP RIA Sample Data

Tube	Duplicate CPM	Average CPM	Corrected CPM	Percent Bound (B/T)	Percent (B/B ₀)	Conc. (pg/mL)
Total Count	10,928 10,931	10,930				
NSB	808 1,055	932		8.5		
calibrator 0	4,603 4,834	4,709	3,777	43.1	100.0	
Calibrators (pg/mL)						
A (19)	4,034 4,058	4,046	3,114		82.5	
B (30)	3,542 3,573	3,558	2,626		69.5	
C (54)	2,768 2,766	2,767	1,835		48.8	
D (140)	1,948 2,028	1,988	1,056		28.0	
E (290)	1,297 1,408	1,352	420		11.1	
Unknown Samples						
1	2,051 2,070	2,060	1,128		29.9	126
2	3,210 3,207	3,209	2,277		60.3	40

Typical sample data and a calibrator curve are shown in TABLE III and FIGURE 1; this information is for reference only and should not be used for the calculation of any value.

VIP SAMPLE CALIBRATOR CURVE

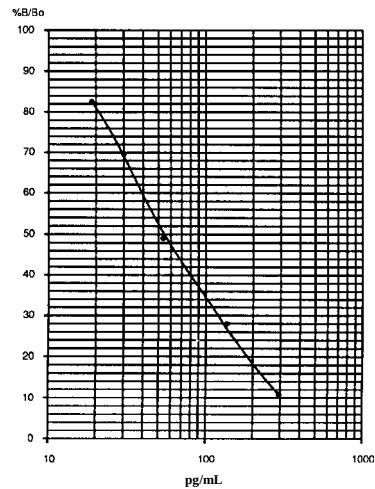


FIGURE 1

The DiaSorin QC lab uses a smoothed spline curve fit.

13. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- 13.1 If the initial concentration of the unknown sample is greater than the highest calibrator, dilute with calibrator 0 only.
- 13.2 Specimens should not be repeatedly frozen and thawed.
- 13.3 Counting times should be sufficient to prevent statistical error (for example, accumulation of 2,000 CPM will yield 5% error; 10,000 CPM will yield 1% error).

14. EXPECTED VALUES

CLINICAL INTERPRETATION OF VALUES

Forty-five normal fasting persons (mean age 28) were sampled for plasma VIP determination. In 21 males, the value was 42.8 ± 11.9 pg/mL VIP (mean $\pm$ standard deviation), and in 24 females, 42.6 ± 7.2 pg/mL. Since there is no significant difference between the values for males and females, the overall average is 42.7 ± 9.5 pg/mL in fasting adults. A tentative two standard deviation range would be 23-63 pg/mL. This normal range may be broader if persons from a hospital population without gastrointestinal disease are used as a control group. Others report the normal range to go up to 200 pg/mL. The normal range in the assay at Ohio State University is undetectable to 170 pg/mL, with an average of 62 ± 44 pg/mL. Since the Ohio State assay report values below 50 as undetectable, their assay is not quite as sensitive as the DiaSorin procedure.

A series of doubled-blinded clinical specimens,* including several VIPomas and ganglioneuroblastomas, were obtained from Dr. Thomas O'Dorisio at Ohio State University. Later, he revealed his results on these same samples; these are shown in TABLE IV. The data demonstrate many extremely elevated VIP values, which are characteristic of VIP-producing tumors, and show that the DiaSorin VIP kit does indeed measure elevated values in humans and compares well with an established research laboratory. The regression equation for the first 22 specimens (excluding the 4 normals with undetectable levels reported by Ohio State) is $y = 0.78x + 32$, where y is the DiaSorin value and x is the Ohio State value. The correlation coefficient is 0.94. The control samples used in the Ohio State laboratory were also measured with the DiaSorin kit. Their low control (Ohio State range <50-100 pg/mL) had a mean value of 53 pg/mL and the high control (Ohio State range 450-1014 pg/mL) was found to be 1077 pg/mL in 3 separate analyses with the DiaSorin kit. Several of these Ohio State samples from normal persons had values ranging from 65-176 pg/mL on the DiaSorin assay. The broad range of pathological samples in WDHA syndrome is typical of the literature and quite similar to the situation of gastrin levels in gastrinoma.

* These specimens had been stored for an unknown amount of time in Dr. O'Dorisio's laboratory. The number of freeze and thaws between their analysis and our analysis is unknown.

TABLE IV
Results of Double-Blind Split Samples With
Dr. Thomas O'Dorisio at Ohio State University
values: picograms/mL

Case	VIP DiaSorin	VIP Ohio State	Comments
I. Ganglioneuroblastoma			
1	1888	1700	symptomatic WDHA
1A	248	135	asymptomatic
1B	464	430	symptomatic WDHA
2	3776	>2000	
2A	4672	1700	
2B	352	225	post resection with diarrhea
II. VIPoma			
1	368*	960	
1A	184	290	post resection
2	1152	1200	metastatic
3	304	290	metastatic after resection
4	208	230	post resection
III. Watery diarrhea with no documented diagnosis			
1	11250	>14500	
2	368	185	
3	928	880	neg. exploration
IV. Watery diarrhea with other tumors			
1	192	390	hypernephroma
2	2360	1500	smallcell carcinoma
3	208	330	hypernephroma with vasodilation
4	272	360	pheochromocytoma
V. Normal patients			
1	64	<50	
2	96	<50	
3	104	<50	
4	96	<50	
5	176	110	
VI. Unknown			
1	720	1150	
2	512	1200	
3	320	170	

* DiaSorin assay was done after several freeze and thaws.

** Regression analysis excluding <50 pairs; $y = 0.79x + 335$; $r = 0.94$;
 y = DiaSorin VIP; x = Ohio State VIP

15. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

15.1 Precision

Intra Assay Variation (values = 5)

Sample Number	Mean Value	S.D	%C.V.
Low	62.6	1.2	1.9
High	87.8	2.6	3.0

Inter Assay Variation (values = 73)

Sample Number	Mean Value	S.D	%C.V.
Low	56.3	5.4	9.58
High	80.4	5.7	7.07

15.2 TRUENESS: THE ASSAY TRUENESS HAS BEEN VERIFIED BY THE DILUTION TEST AND THE RECOVERY TEST.

Linearity (Parallelism)

Serial Dilution Study of five Patient Samples (Values = pg/mL)

Sample Number	1/8	1/16	1/32
1	1584	1696	1888
2	3040	4192	4672
3	>3200	3440	3776
	1/10	1/15	1/20
4	2630	2130	2360
	1/100	1/150	1/200
5	7200	11250	10400

Recovery (Accuracy) (Values = pg/mL)

TABLE V

Recoveries of VIP at Several Level Approximating the Normal Range from Fresh Plasma Containing EDTA and Aprotinin (Each point is the mean of duplicate analyses)

Plasma Sample	VIP Added (pg/mL)	VIP Found (pg/mL)	Recovery %	VIP Plasma Sample	VIP Added (pg/mL)	VIP Found (pg/mL)	Recovery %
1	0	14	--	3	0	14	--
	25	38	97		25	33	85
	50	50	78		50	48	75
	100	85	75		100	86	75
2	0	2	--	4	0	14	--
	25	23	85		25	38	90
	50	48	92		50	50	75
	100	80	78		100	80	68
			Mean Recovery	25	89%		
				50	80%		
				100	74%		

15.3 Analytical Sensitivity

When defined as the apparent concentration at 3 standard deviations from the counts at maximum binding, the minimum detectable amount is 1.0 pg/tube (5 pg/mL).

15.4 Analytical Specificity

Comparison of the cross-reactivity of the VIP antibody was made with the following peptides:

Peptides	% Cross-reactivity
Somatostatin	<0.1
pMotilin	<0.1
pGastrin Inhibitory Polypeptide (GIP)	<0.1
Glucagon	<0.1
pGastrin Releasing Peptide (GRP)	<0.1
Gastrin ¹⁷ I	<0.1
Gastrin ³⁴ I	<0.1
pSecretin	<0.1
hPancreatic Polypeptide (PPP)	<0.1
hProinsulin	<0.1
pInsulin	<0.1
Cholecystokinin (CCK8)	<0.1
Substance P	<0.1
Neurotensin	<0.1
Methionine Enkephalin	<0.1
Leucine Enkephalin	<0.1
Bombesin	<0.1

REFER TO LAST PAGE FOR REFERENCES

SCHEME OF THE ASSAY

1. CAUTION: Set up assay on crushed ice. VIP is labile in plasma stored at room temperature; therefore, this precaution is necessary to obtain valid results
2. Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen specimens to thaw completely. Do not allow reagents to reach above 25°C. Identify tubes in duplicate.
3. Dispense reagents according to the following scheme.

Tubes/Reagents	Total Counts	NSB	Cal 0-5	Controls and unknown samples
VIP Citrate Buffer	-	100 µl	200 µL	-
Calibrators (0-5)	-	200 µL	200 µL	-
Controls	-	-	-	200 µL
Unknown Samples	-	-	-	200 µL
Antiserum	-	-	100 µL	100 µL

4. Cover the tubes with parafilm and vortex gently.
5. Incubate for 24 hours +/- 2 hours at 2-8°C.
6. Dispense 100 µL of the tracer into all wells.
7. Cover and vortex gently.
8. Incubate for 24 hours +/- 2 hours at 2-8°C.
9. Dispense 1mL of 0.85% saline into all wells except the total count tubes.
10. Dispense 500 µL of the GAR-PPT into all wells except the total count tubes.
11. Cover the tubes and vortex gently.
12. Incubate for 2 hours +/- 15 minutes at 2-8 °C.
13. Centrifuge using 760 x g* for 20 minutes.
14. Decant the supernatants.
15. Count each tube in a gamma counter for 60 seconds or longer.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DU PEPTIDE INTESTINAL VASO-ACTIF (VIP)

1. INDICATION

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*

Cette trousse permet la détermination quantitative du peptide intestinal vaso-actif (VIP) dans le plasma par dosage radio-immunologique (RIA).

2. RÉSUMÉ ET COMMENTAIRE

Le VIP est composé de 28 amino-acides et est initialement extrait de l'intestin grêle du cochon.^{1,2} Sa séquence des amino-acides, par comparaison à plusieurs peptides apparentés, est la suivante :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
VIP	His-	Ser-	Asp-	Ala-	Val-	Phe-	Thr-	Asp-	Asn-	Tyr-	Tyr-	Arg-	Leu-	Arg
Sécrétine	His-	Ser-	Asp-	Gly-	Thr-	Phe-	Thr-	Ser-	Glu-	Leu-	Ser-	Arg-	Leu-	Arg
Glucagon	His-	Ser-	Gln-	Gly-	Thr-	Phe-	Thr-	Ser-	Asp-	Tyr-	Ser-	Lys-	Tyr-	Leu
GIP	Tyr-	Ala-	Gln-	Gly-	Thr-	Phe-	Ile-	Ser-	Asp-	Tyr-	Ser-	Lys-	Ala-	Met

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
VIP	Lys-	Gln-	Met-	Ala-	Val-	Lys-	Lys-	Tyr-	Leu-	Asn-	Ser-	Ile-	Leu-	Asn (NH ₂)
Sécrétine	Asp-	Ser-	Ala-	Arg-	Leu-	Gln-	Asp-	Leu-	Leu-	Gln-	Gly-	Leu-	Val	(NH ₂)
Glucagon	Asp-	Ser-	Arg-	Arg-	Ala-	Gln-	Asp-	Phe-	Val-	Gln-	Trp-	Leu-	Met-	Asn-Thr
GIP	Asp-	Lys-	Ile-	Arg-	Gln-	Gln-	Asp-	Phe-	Val-	Asn-	Trp-	Leu-	Leu-	Ala-etc.

Il existe des similarités entre le groupement amino-terminal du VIP et les groupements amino-terminal de la sécrétine, du glucagon et du peptide inhibiteur gastrique (GIP). Le groupement carboxy-terminal (c'est-à-dire les résidus 15-28), est cependant bien différent.

On trouve le VIP dans tout le tube digestif, où Bloom et Polak ont remarqué que les concentrations tissulaires de VIP étaient supérieures à toutes les autres concentrations de peptide intestinal.³ Les effets périphériques du VIP dans l'intestin sont : augmentation du débit de suc alcalin en provenance du pancréas¹ inhibition de la production d'acide gastrique^{4,5} stimulation de la libération d'insuline⁶ hyperglycémie provoquée par la 'glycogénolyse' stimulation de la production du suc de l'intestin grêle et augmentation de la teneur en adénosine monophosphate cyclique (AMP cyclique) de l'intestin.^{8,9}

On trouve aussi des concentrations élevées de VIP dans tout le système nerveux central, où ses effets vasodilatateurs et hypotensifs sur le système cardiovasculaire sont importants, et dans le système respiratoire où il facilite la bronchodilatation et augmente la ventilation.¹⁰ On trouve le VIP en grande partie dans les neurones et un peu dans les cellules endocrines, et il semble être libéré par l'intermédiaire de la stimulation des neurones.¹⁰⁻¹⁴

La mesure de VIP permet de détecter la présence de certaines tumeurs des îlots pancréatiques qui sécrètent des quantités excessives de ce peptide. Cette condition est connue sous le nom de syndrome de Verner et Morrison,¹⁵ et est caractérisée par une diarrhée aqueuse résistante, hypokaliémie et achlorhydrie (syndrome WDHA). Les individus qui ont ce syndrome ont des taux de VIP plasmatiques très élevés, souvent des milliers de fois supérieurs à la concentration normale.¹⁶⁻¹⁸ Une autre forme de diarrhée qui se manifeste par des symptômes très similaires à ceux du syndrome de Verner et Morrison est le résultat d'une hyperplasie des îlots. Cependant, à la différence du syndrome de Verner et Morrison, cette condition est caractérisée par des taux normaux de VIP ; ces cas ont été désignés par Bloom et Polak comme le pseudo syndrome de Verner et Morrison.^{3,19} Les tumeurs différentes de celles des îlots qui produisent des taux élevés de VIP incluent : le ganglioneuroblastome, le cancer broncho-pulmonaire, le phéochromocytome, le cancer médullaire de la thyroïde et l'histiocytome rétropéritonéal.^{15,21-23}

3. DESCRIPTION DE LA METHODE DE DOSAGE

Le VIP est mesuré par dosage radio-immunologique en utilisant l'addition retardée d'un traceur pour augmenter la sensibilité. L'échantillon et l'anti-VIP de lapin sont ajoutés, puis le tout est incubé pendant 24 heures entre 2 et 8°C. Du - ¹²⁵I VIP est ensuite ajouté avant de procéder à une deuxième incubation pendant 24 heures entre 2 et 8 °C. Un vecteur préalablement précipité, un deuxième anticorps et le polyéthylène-glycol sont ajoutés en une seule étape. Le dosage peut être centrifugé et décanté après deux heures d'incubation minimum entre 2 et 8°C.-

4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Tampon citrate VIP	1 tube/2 ml
Étalon 0 VIP	1 tube/ 5 ml
Étalons VIP (0-5)	5 tubes/2 ml
Antisérum VIP	1 tube/12,5 ml
¹²⁵ I VIP	1 tube/12,5 ml
Complexe précipitant (GAR-PPT)	1 tube/35 ml
Contrôles VIP (niveaux 1 et 2)	2 tubes/2 ml
Nombre de dosages	125

CONSERVATION : Dès réception, et avant reconstitution, tous les réactifs doivent être stockés entre 2 et 8°C. Après reconstitution, stocker tous les réactifs à une température inférieure ou égale à -15° C jusqu'à la date de péremption sur l'étiquette. Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption.

Pendant la reconstitution du contenu des tubes, agiter délicatement pour éviter la formation de mousse. Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

4.1 Tampon citrate VIP : réactif lyophilisé

Le tampon BSA-citrate contient du thimérosal comme conservateur. Reconstituer le flacon avec 2 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger avant utilisation.

4.2 Étalon 0 VIP : réactif lyophilisé

Du plasma citraté est dilué dans le tampon BSA-citrate contenant du thimérosal et d'autres conservateurs. Reconstituer le flacon avec 5 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger avant utilisation.

4.3 Étalons VIP : réactif lyophilisé

Les étalons VIP, à une concentration nominale allant de 25 à 400 pg/ml, sont prédilué dans du plasma sans VIP et du tampon BSA-citrate. Les valeurs exactes des concentrations sont attribuées selon chaque lot. Reconstituer chaque tube avec 2,0 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer entre 15 et 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger avant utilisation. Cette trousse est étalonnée avec du VIP synthétique. L'étalon démontre sa commutabilité avec les échantillons des patients lorsqu'il est utilisé avec les réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique *in vitro*, comme recommandé.

4.4 Antisérum VIP : réactif lyophilisé

Le sérum anti-VIP de lapin est dilué dans un tampon BSA-borate contenant du thimérosal. Reconstituer le flacon avec 12,5 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger avant utilisation.

4.5 ¹²⁵I VIP: réactif lyophilisé

Le VIP est marqué à l'iode ¹²⁵ et dilué dans un tampon BSA-citrate-EDTA contenant du thimérosal et d'autres stabilisants. Reconstituer le flacon avec 12,5 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu ; bien mélanger avant utilisation.

4.6 Complexe précipitant (GAR-PPT) : réactif lyophilisé

Le sérum de lapin normal, pré-précipité avec du sérum anti-lapin de chèvre et du polyéthylène glycol (PEG), est dilué dans un tampon BSA-borate contenant du thimérosal et d'autres conservateurs. Reconstituer chaque tube avec 35 ml d'eau purifiée; bien mélanger jusqu'à ce que la suspension apparaisse homogène et laisser reposer pendant 30 minutes minimum à température ambiante ; mélanger de temps en temps.

4.7 Contrôle VIP (niveaux 1 et 2) : réactif lyophilisé

Le plasma humain défibriné est dosé, si besoin est, avec la quantité appropriée de VIP pour obtenir une concentration comprise dans l'intervalle spécifié. De l'azide de sodium est ajouté comme conservateur. Reconstituer chaque tube avec 2,0 ml d'eau purifiée, mélanger et laisser reposer pendant 15 à 20 minutes jusqu'à dissolution complète du contenu.

5. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO* UNIQUEMENT.

Non prévu pour une utilisation interne ou externe sur l'homme ou l'animal.

RÉACTIFS CONTENANT DES PRODUITS D'ORIGINE HUMAINE

Traiter comme potentiellement infectieux.

Chaque don de sérum/plasma intervenant dans la préparation de ce produit a été testé par une méthode US agréée par la FDA et s'est avéré non réactif en présence de HBsAg, d'anticorps anti-VHC et d'anticorps anti-VIH1/2. Même si ces méthodes sont extrêmement précises, elles ne garantissent pas la détection de tous les dons infectés. Ce produit peut également contenir d'autres produits d'origine humaine pour lesquelles il n'existe aucun test agréé. Comme aucune méthode de test connue ne peut offrir l'assurance complète de l'absence du virus de l'hépatite B (HBV) ou de l'hépatite C (HCV), du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou d'autres agents infectieux, tous les produits d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en prenant les précautions appropriées décrites dans le document U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4^{ème} éd., mai 1999 ou dernière édition.

RÉACTIFS CONTENANT DE L'AZIDE DE SODIUM

ATTENTION : Certains réactifs de cette trousse contiennent de l'azide de sodium. L'azide de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre et former des azotures ultra-explosifs. Pour leur mise au rebut, rincer à grande eau pour empêcher l'accumulation d'azide. Pour plus d'informations, consulter "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," dans le manuel Guide-Safety Management No. CDC-22 publié par les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/EC)

R20/21/22 - Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.

R32 - Un contact avec les acides dégage un gaz très toxique.

S28 - Après un contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau.

RÉACTIFS CONTENANT DU THIMÉROSAL

Certains réactifs de cette trousse contiennent du thimérosal contenant un composant de mercure. La mise au rebut du mercure élémentaire, du mercure inorganique, des oxydes de mercure et des composants de mercure, doit être effectuée en respectant scrupuleusement les réglementations locales, nationales et fédérales.

AVERTISSEMENT : Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme provoquant des malformations à la naissance et des troubles de la reproduction.

RÉACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 2 μCi (74 kBq) d'iode 125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, de laboratoires cliniques

ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire *in vitro* n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radiologique. Tout article en verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles en verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

AVERTISSEMENT : Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme étant cancérigène.

ATTENTION : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

6. INDICATIONS D'UNE DÉTÉRIORATION POSSIBLE DES RÉACTIFS DE LA TROUSSE

- 6.1 Présence de particules anormales dans l'un quelconque des réactifs.
- 6.2 Écart de pente ou de position de la courbe d'étalonnage par rapport à la normale obtenue.
- 6.3 Diminution de la liaison maximale.
- 6.4 Haute liaison non spécifique

7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Deux cent microlitres de plasma sur EDTA contenant de l'aprotinine, en doublet, sont nécessaires pour le dosage du VIP. Les échantillons de plasma peuvent être dosés directement, sans extraction préalable.

L'utilisation de plasma contenant de l'EDTA et de l'aprotinine est nécessaire lors du prélèvement initial du VIP.

Prélever le sang dans un tube en verre sous vide de 5 ml ou 10 ml en utilisant l'EDTA comme anticoagulant. Ajouter immédiatement de l'aprotinine, à une concentration de 2 500 KIU/5 ml de sang entier, dans le tube de prélèvement pour empêcher la dégradation du VIP dans l'échantillon. Centrifuger immédiatement les échantillons pendant 15 minutes à 760 x g** pour obtenir du plasma non hémolysé. Séparer le sérum des cellules et mettre dans des tubes de stockage.

Si l'échantillon n'est pas utilisé immédiatement, conserver à une température inférieure ou égale à -15°C. Ne pas congeler un échantillon qui a été décongelé.
Tous les plastiques, articles en verre ou autres produits entrant en contact avec l'échantillon ne doivent absolument pas être contaminés.

8. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

- 8.1 Tubes en verre borosilicaté jetables, 12 x 75 mm.
- 8.2 Centrifugeuse à thermostat pour tubes 12 x 75 mm.
- 8.3 Compteur à scintillation gamma pouvant mesurer l'iode 125.
- 8.4 Vortex.
- 8.5 Pipettes proposées :
 - a. Micropipettes graduées pour distribuer 100 µl et 200 µl.
 - b. Pipettes à répétition graduées pour distribuer 100 µl, 500 µl et 1 ml.
- 8.6 solution salée à 0,85%.
- 8.7 Eau purifiée.

9. PROCÉDURE DE DOSAGE

ATTENTION : PRÉPARER LES ÉLÉMENTS DU DOSAGE SUR DE LA GLACE PILÉE. VIP EST LABILE DANS LE PLASMA CONSERVÉ À TEMPÉRATURE AMBIANTE ; IL EST DONC NÉCESSAIRE DE RESPECTER CETTE PRÉCAUTION AFIN D'OBTENIR DES RÉSULTATS VALIDES.

- 9.1 Reconstituer les réactifs lyophilisés et permettre aux réactifs congelés de décongeler complètement. Ne pas laisser les réactifs atteindre une température supérieure à 25 °C. Mélanger délicatement tous les réactifs avant utilisation.
- 9.2 Installer des tubes en verre jetables de 12 x 75 mm étiquetés en doublet selon le Profil de dosage de la dernière page.
- 9.3 Ajouter les réactifs comme suit :
 - a. **Tubes de numération totale**
Laisser de côté jusqu'à l'étape 5
 - b. **Tubes de liaison non spécifique (NSB)**
200 µl d'étalon 0
100 µl de tampon citrate VIP
 - c. **Étalon 0**
200 µl d'étalon 0
100 µl d'antisérum VIP
 - d. **Étalons VIP (A-E)**
200 µl d'étalon VIP
100 µl d'antisérum VIP
 - e. **Contrôles et échantillons inconnus**
200 µl de plasma
100 µl d'antisérum VIP
- 9.4 Mélanger doucement les tubes à l'aide du vortex sans former de mousse et les incubent pendant 24 heures (±2 heures) entre 2 et 8°C.
- 9.5 Ajouter 100 µl de 125I VIP dans tous les tubes.
- 9.6 Mélanger doucement les tubes à l'aide du vortex sans former de mousse et les incubent pendant 24 heures (±2 heures) entre 2 et 8°C.
- 9.7 Ajouter 1 ml de solution salée à 0,85% dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale.

$$^{**} g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

- 9.8 Mélanger vigoureusement le GAR-PPT ; ajouter 500 µl dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale.
- 9.9 Mélanger doucement les tubes à l'aide du vortex sans former de mousse et les incubent pendant 2 heures (± 15 minutes) entre 2 et 8°C.
- 9.10 Centrifuger les tubes à 760 x g* pendant 20 minutes entre 20 et 25°C.
- 9.11 Décantier immédiatement le surnageant dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale, en les renversant pendant 2 minutes minimum. Placer les tubes sur du papier absorbant pour éliminer toutes les gouttes de surnageant qui peuvent rester sur les bords avant de les replacer à l'endroit.
- 9.12 Utiliser un compteur à scintillation gamma pour effectuer la numération du précipité dans chaque tube et des tubes de numération totale pendant 60 secondes minimum (consulter la section Limitations de la procédure).

10. COMMENTAIRES SUR LA PROCÉDURE

- 10.1 Doser tous les échantillons en doublet pour garantir la validité des valeurs obtenues.
- 10.2 Ajouter chaque aliquote de réactif dans le tiers inférieur du tube à essai, de manière à assurer le mélange complet des réactifs.
- 10.3 Certains fabricants vendent des tubes jetables qui donnent des liaisons non spécifiques élevées.
- 10.4 Si le surnageant est aspiré dans le précipité, prendre soin de ne pas remuer le précipité.
- 10.5 Tout échantillon inconnu ayant une valeur supérieure à l'étalon le plus élevé doit être dilué avec l'étalon 0 et dosé de nouveau. Corriger le résultat à l'aide du facteur de dilution approprié.
- 10.6 Lors de la centrifugation, la température doit être contrôlée pour ne pas dépasser 25°C.
- 10.7 Pour surveiller complètement la précision constante d'un dosage RIA, il faut parfois vérifier des facteurs supplémentaires. DiaSorin suggère de vérifier les paramètres suivants afin d'assurer la constance des performances de la trousse.
 - a. Numérations totales
 - b. Liaison maximale
Numérations moyennes par minute (CPM) des tubes de l'étalon 0/CPM moyenne des tubes de numération totale.
 - c. Liaison non spécifique
CPM moyenne des tubes NSB/CPM moyenne des tubes de numération totale.
 - d. Pente de la courbe d'étalonnage
Par exemple, surveiller les points d'inhibition de 80, 50 et 20 % de la courbe d'étalonnage.

11. CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit inclure au moins deux contrôles de la trousse pour chaque dosage afin de garantir la validité de leurs résultats. Déterminer ensuite la moyenne et l'écart-type pour chaque contrôle, sur un minimum de dix dosages. Une gamme de valeurs acceptable peut donc être obtenue pour ces contrôles en utilisant l'écart-type ± 2 par rapport aux valeurs précédemment calculées. Le laboratoire de contrôle qualité de DiaSorin a déterminé un intervalle pour les contrôles fournis dans cette trousse. Ces intervalles sont imprimés sur les tubes de contrôle qualité.

12. CALCUL DES RÉSULTATS

Il existe de nombreuses méthodes de calcul des résultats des dosages radio-immunologiques. Chacune est basée sur l'obtention d'une courbe d'étalonnage en traçant l'ampleur de la liaison par rapport aux concentrations indiquées pour les étalons.

Ce graphe peut être à l'échelle linéaire ou logarithmique. Chacune de ces méthodes donne essentiellement les mêmes valeurs pour les contrôles et les échantillons, même si certains dosages peuvent être mieux "adaptés" à une méthode particulière que d'autres. La méthode de calcul pour le laboratoire de contrôle qualité DiaSorin est % B/B₀ par rapport à la concentration logarithmique.

- 12.1** Calculer la CPM moyenne pour chaque étalon, contrôle et échantillon inconnu.
- 12.2** Soustraire la CPM moyenne des tubes NSB de toutes les numérations.
- 12.3** Diviser les CPM corrigées de chaque étalon, contrôle ou échantillon par les CPM corrigées de l'étalon 0.

$$\frac{\text{CPM de l'étalon ou de l'échantillon inconnu} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM de l'étalon 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

- 12.4** En utilisant du papier semi-logarithmique ou logarithmique à deux cycles, tracer le pourcentage B/B₀ pour les étalons VIP (axe vertical) par rapport à la concentration (axe horizontal).
- 12.5** Tracer la droite de meilleur ajustement d'un point à l'autre.
- 12.6** Interpoler les niveaux de VIP dans les échantillons inconnus à l'aide du tracé.
- 12.7** Si un échantillon inconnu a été dilué, corriger en fonction du facteur de dilution approprié.
- 12.8** Calculer la liaison maximale en divisant la CPM de l'étalon 0 par les numérations totales moyennes obtenues dans les tubes de numération totale.

TABLEAU III
Données d'échantillon RIA VIP DiaSorin

Tube	CPM en doublet	CPM moyenne	CPM corrigée	Pourcentage de liaison (B/T)	Pourcentage (B/B ₀)	Conc. (pg/ml)
Numération tot.	10 928 10 931	10 930				
NSB	808 1 055	932		8,5		
étalon 0	4 603 4 834	4 709	3 777	43,1	100,0	
Etalons (pg/ml)						
A (19)	4 034 4 058	4 046	3 114		82,5	
B (30)	3 542 3 573	3 558	2 626		69,5	
C (54)	2 768 2 766	2 767	1 835		48,8	
D (140)	1 948 2 028	1 988	1 056		28,0	
E (290)	1 297 1 408	1 352	420		11,1	
Échantillons inconnus						
1	2 051 2 070	2 060	1 128		29,9	126
2	3 210 3 207	3 209	2 277		60,3	40

Des données d'échantillons typiques et une courbe d'étalonnage sont présentées au TABLEAU III et à la FIGURE 1 ; ces informations sont proposées à titre de référence uniquement et ne peuvent en aucun cas être utilisées pour calculer des valeurs.

COURBE D'ÉTALONNAGE POUR L'ÉCHANTILLON VIP

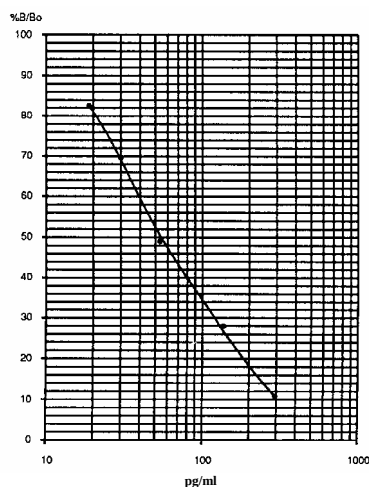


FIGURE 1

Le laboratoire CQ DiaSorin utilise un programme d'ajustement "smoothed spline curve".

13. LIMITES DU DOSAGE

- 13.1 Si la concentration initiale d'un échantillon à déterminer est supérieure à la valeur de l'étalon le plus haut, le diluer avec l'étalon 0 uniquement.
- 13.2 Ne pas congeler un échantillon qui a été décongelé.
- 13.3 Les temps de numération doivent être suffisants pour empêcher l'erreur statistique (par exemple, l'accumulation de 2 000 CPM donnera une erreur de 5 %; 10 000 CPM donneront une erreur de 1 %).

14. VALEURS ATTENDUES

INTERPRÉTATION CLINIQUE DES VALEURS

Quarante-cinq personnes normales à jeun (moyenne d'âge de 28 ans) ont été choisies pour étudier la concentration de VIP dans le plasma. Chez 21 hommes, la valeur était de $42,8 \pm 11,9$ pg/ml de VIP (moyenne $\pm$ écart-type), et chez 24 femmes, $42,6 \pm 7,2$ pg/ml. Comme il n'y a pas de différence significative entre les valeurs trouvées chez les hommes et les femmes, la moyenne globale est de $42,7 \pm 9,5$ pg/ml chez les adultes à jeun. On suggère un intervalle à deux écarts-types allant de 23 à 63 pg/ml. Cet intervalle normal peut être plus large si des patients hospitalisés qui ne souffrent pas de maladie gastro-intestinale sont utilisés comme groupe de contrôle. D'autres personnes ont observé que l'intervalle normal peut atteindre 200 pg/ml. L'intervalle normal lors du dosage à l'université de l'État de l'Ohio n'est pas détectable jusqu'à 170 pg/ml, avec une moyenne de 62 ± 44 pg/ml. Comme l'État de l'Ohio signale que les valeurs inférieures à 50 ne sont pas détectables, leur dosage n'est pas aussi sensible que la procédure de DiaSorin.

Une série d'échantillons cliniques en double aveugle,* comprenant plusieurs VIPomes et ganglioneuroblastomes, était obtenue du Dr. Thomas O'Dorisio de l'université de l'État de l'Ohio. Les résultats qu'il a obtenus sur ces mêmes échantillons sont rassemblés dans le TABLEAU IV. Les données montrent des valeurs de VIP extrêmement élevées qui caractérisent les tumeurs productrices de VIP et montrent que la trousse VIP DiaSorin mesure vraiment les valeurs élevées chez l'homme et est aussi fiable qu'un laboratoire de recherche établi. L'équation de régression pour les 22 premiers échantillons (à l'exclusion des 4 échantillons normaux avec des taux non détectables rapportés par l'État de l'Ohio) est $y = 0,78x + 32$, où y est la valeur de

DiaSorin et x la valeur de l'État de l'Ohio. Le coefficient de corrélation est de 0,94. Les échantillons de contrôle utilisés dans le laboratoire de l'État de l'Ohio ont aussi été mesurés avec la trousse DiaSorin. Lors de 3 analyses séparées avec la trousse DiaSorin, leur contrôle bas (intervalle de l'État de l'Ohio <50-100 pg/ml) avait une valeur moyenne de 53 pg/ml et le contrôle élevé (intervalle de l'État de l'Ohio 450-1014 pg/ml) était de 1077 pg/ml. Plusieurs de ces échantillons de l'État de l'Ohio obtenus chez des personnes normales avaient des valeurs allant de 65 à 176 pg/ml lors du dosage DiaSorin. L'intervalle étendu des échantillons des pathologies du syndrome WDHA est typique de la littérature et plutôt similaire aux taux de gastrine obtenus dans les cas de gastrinome.

* Ces échantillons avaient été stockés pendant un temps inconnu dans le laboratoire du Dr O'Dorisio. On ne connaît pas le nombre de congélation et décongélation entre leur analyse et notre analyse.

TABLEAU IV
Résultats des échantillons fractionnés en double aveugle avec
le Dr. Thomas O'Dorisio à l'université de l'État de l'Ohio
valeurs : picogrammes/ml

Cas	VIP DiaSorin	VIP État de l'Ohio	Commentaires
I. Ganglioneuroblastome			
1	1 888	1 700	WDHA symptomatique
1A	248	135	asymptomatique
1B	464	430	WDHA symptomatique
2	3 776	>2 000	
2A	4 672	1 700	
2B	352	225	post-résection avec diarrhées
II. VIPome			
1	368*	960	
1A	184	290	post-résection
2	1 152	1 200	métastatique
3	304	290	métastatique après résection
4	208	230	post-résection
III. Diarrhée aqueuse sans diagnostic documenté			
1	11 250	>14 500	
2	368	185	
3	928	880	exploration négative
IV. Diarrhée aqueuse avec d'autres tumeurs			
1	192	390	hypernéphrome
2	2 360	1 500	cancer à petites cellules
3	208	330	hypernéphrome avec vasodilatation
4	272	360	phéochromocytome
V. Patients normaux			
1	64	<50	
2	96	<50	
3	104	<50	
4	96	<50	
5	176	110	
VI. Inconnu			
1	720	1 150	
2	512	1 200	
3	320	170	

* Le dosage DiaSorin a été fait après plusieurs congélations et décongélation.

** Analyse de régression excluant <50 paires ; $y = 0,79x + 335$; $r = 0,94$;
 $y = \text{VIP DiaSorin}$; $x = \text{VIP Etat de l'Ohio}$

15. CRITÈRES DE QUALITÉ

15.1 Précision

Variation intra-essai (valeurs = 5)

Numéro d'échantillon	Valeur moyenne	Ecart-type	% C.V.
Bas	62,6	1,2	1,9
Élevé	87,8	2,6	3,0

Variation entre les essais (valeurs = 73)

Numéro d'échantillon	Valeur moyenne	Ecart-type	% C.V.
Bas	56,3	5,4	9,58
Élevé	80,4	5,7	7,07

15.2 PURETÉ : LA PURETÉ DU DOSAGE A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR LES TESTS DE DILUTION ET DE RÉCUPÉRATION.

Linéarité (Parallélisme)

Étude de dilution en série sur cinq échantillons patient (Valeurs = pg/ml)

Numéro d'échantillon	1/8	1/16	1/32
1	1 584	1 696	1 888
2	3 040	4 192	4 672
3	>3 200	3 440	3 776
	1/10	1/15	1/20
4	2 630	2 130	2 360
	1/100	1/150	1/200
5	7 200	11 250	10 400

Récupération (Exactitude) (Valeurs = pg/ml)

TABLEAU V

Récupération de VIP à plusieurs taux proches de l'intervalle normal à partir de plasma frais contenant de l'EDTA et de l'aprotinine (Chaque point est la moyenne d'analyses en doublet)

Echantillon de plasma	VIP ajouté (pg/ml)	VIP trouvé (pg/ml)	Récupération %	Echantillon de plasma VIP	VIP ajouté (pg/ml)	VIP trouvé (pg/ml)	Récupération %
1	0	14	--	3	0	14	--
	25	38	97		25	33	85
	50	50	78		50	48	75
	100	85	75		100	86	75
2	0	2	--	4	0	14	--
	25	23	85		25	38	90
	50	48	92		50	50	75
	100	80	78		100	80	68
			Récupération moyenne	25	89%		
				50	80%		
				100	74%		

15.3 Sensibilité analytique

Définie comme la concentration obtenue à 3 écarts-types de l'activité de liaison maximale, la quantité minimale décelable est de 1,0 pg/tube (5 pg/ml).

15.4 Spécificité analytique

La comparaison de la réactivité croisée de l'anticorps anti-VIP a été effectuée avec les peptides suivants :

Peptides	% Réactivité croisée
Somatostatine	<0,1
pMotiline	<0,1
Peptide inhibiteur pGastrine (GIP)	<0,1
Glucagon	<0,1
Peptide libérateur de pGastrine (GRP)	<0,1
Gastrine ¹²⁷ I	<0,1
Gastrine ³⁴ I	<0,1
pSécrétine	<0,1
Polypeptide hPancréatique (PPP)	<0,1
hProinsuline	<0,1
pInsuline	<0,1
Cholécystokinine (CCK8)	<0,1
Substance P	<0,1
Neurotensine	<0,1
Méthionine-enképhaline	<0,1
Leucine- enképhaline	<0,1
Bombesine	<0,1

VOIR LA DERNIÈRE PAGE POUR RÉFÉRENCE

PROCÉDURE DE DOSAGE

1. ATTENTION : Préparer les éléments du dosage sur de la glace pilée. VIP est labile dans le plasma conservé à température ambiante ; il est donc nécessaire de respecter cette précaution pour obtenir des résultats valides.
2. Reconstituer les réactifs lyophilisés et permettre aux échantillons congelés de décongeler complètement. Ne pas laisser les réactifs atteindre une température supérieure à 25 °C. Identifier les tubes en double.
3. Ajouter les réactifs dans les tubes comme suit :

Tubes/Réactifs	Numé- rations totales	NSB	Étalon 0-5	Contrôles et échantillons inconnus
Tampon citrate VIP	-	100 µl	200 µl	-
Étalons (0-5)	-	200 µl	200 µl	-
Contrôles	-	-	-	200 µl
Échantillons inconnus	-	-	-	200 µl
Antisérum	-	-	100 µl	100 µl

4. Couvrir les tubes avec du parafilm et agiter délicatement à l'aide du vortex.
5. Incuber pendant 24 heures +/- 2 heures entre 2 et 8°C.
6. Distribuer 100 µl de traceur dans tous les puits.
7. Couvrir et mélanger doucement à l'aide du vortex.
8. Incuber pendant 24 heures +/- 2 heures entre 2 et 8°C.
9. Distribuer 1ml de solution salée à 0,85% dans tous les puits à l'exception des tubes de numération totale.
10. Distribuer 500 µl de GAR-PPT dans tous les puits, à l'exception des tubes de numération totale.
11. Couvrir les tubes et agiter doucement à l'aide du vortex.
12. Incuber pendant 2 heures +/- 15 minutes entre 2 et 8 °C.
13. Centrifuger à 760 x g* pendant 20 minutes.
14. Décanter les surnageants.
15. Compter chaque tube dans un compteur gamma pendant 60 secondes minimum.

$$*g = (1\,118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

RADIOIMMUNOASSAY FÜR VASOAKTIVES INTESTINALES PEPTID (VIP)

1. VERWENDUNGSZWECK

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

Dieses Kit dient zur quantitativen Bestimmung von vasoaktivem intestinalem Peptid (VIP) im Plasma durch Radioimmunoassay (RIA).

2. ÜBERBLICK UND ERKLÄRUNG

VIP ist eine aus 28 Aminosäuren bestehende Zusammensetzung, die ursprünglich aus dem Dünndarm des Schweins extrahiert wurde.^{1,2} Im Vergleich zu verschiedenen verwandten Peptiden weist VIP die folgende Aminosäuresequenz auf:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
VIP	His-	Ser-	Asp-	Ala-	Val-	Phe-	Thr-	Asp-	Asn-	Tyr-	Tyr-	Arg-	Leu-	Arg
Sekretin	His-	Ser-	Asp-	Gly-	Thr-	Phe-	Thr-	Ser-	Glu-	Leu-	Ser-	Arg-	Leu-	Arg
Glukagon	His-	Ser-	Gln-	Gly-	Thr-	Phe-	Thr-	Ser-	Asp-	Tyr-	Ser-	Lys-	Tyr-	Leu
GIP	Tyr-	Ala-	Gln-	Gly-	Thr-	Phe-	Ile-	Ser-	Asp-	Tyr-	Ser-	Lys-	Ala-	Met

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
VIP	Lys-	Gln-	Met-	Ala-	Val-	Lys-	Lys-	Tyr-	Leu-	Asn-	Ser-	Ile-	Leu-	Asn (NH ₂)
Sekretin	Asp-	Ser-	Ala-	Arg-	Leu-	Gln-	Asp-	Leu-	Leu-	Gln-	Gly-	Leu-	Val	(NH ₂)
Glukagon	Asp-	Ser-	Arg-	Arg-	Ala-	Gln-	Asp-	Phe-	Val-	Gln-	Trp-	Leu-	Met-	Asn-Thr
GIP	Asp-	Lys-	Ile-	Arg-	Gln-	Gln-	Asp-	Phe-	Val-	Asn-	Trp-	Leu-	Leu-	Ala-etc.

Es bestehen Ähnlichkeiten zwischen dem Aminosäure-Endbereich von VIP und den Aminosäure-Endbereichen von Sekretin, Glukagon und dem gastrischen inhibitorischen Polypeptid (GIP). Der carboxyterminale Bereich (d. h. die Reste 15-28) ist jedoch völlig unterschiedlich.

VIP ist im gesamten Gastrointestinaltrakt sehr verbreitet, für den Bloom und Polak herausgefunden haben, dass die Gewebekonzentrationen von VIP höher sind als bei anderen Darmpeptiden.³ Zu den peripheren Auswirkungen von VIP im Darm zählen ein erhöhter alkalischer Sekretfluss aus dem Pankreas¹, die Hemmung der Magensäureproduktion^{4,5}, die Stimulation der Insulinfreisetzung⁶, Hyperglykämie infolge von Glykogenolyse⁷, die Stimulation des Dünndarmsekretflusses sowie ein erhöhter Gehalt von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) im Darm.^{8,9}

Außerdem wird VIP in hoher Konzentration im gesamten zentralen Nervensystem gefunden, wo es eine starke vasodilatatorische und hypotone Wirkung auf das kardiovaskuläre System hat, sowie im respiratorischen System, wo es die Bronchodilatation beeinflusst und die Beatmung verbessert.¹⁰ VIP befindet sich sowohl in Neuronen als auch in endokrinen Zellen - jedoch überwiegend in Ersteren - und scheint durch neuronale Stimulation freigesetzt zu werden.¹⁰⁻¹⁴

Die VIP-Messung dient zur Erforschung bestimmter Arten von Tumoren der Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse, die übermäßig hohe Mengen des Peptids sekretieren. Dieser Zustand wurde als "Verner-Morrison-Syndrom" bezeichnet¹⁵ und ist durch hartnäckige wässrige Diarrhö, Hypokaliämie und Achlorhydrie (WDHA-Syndrom) charakterisiert. Personen mit diesem Syndrom weisen stark erhöhte VIP-Konzentrationen im Plasma auf, die häufig gegenüber der normalen Konzentration um einige tausend Mal erhöht sind.¹⁶⁻¹⁸ Eine andere Form der Diarrhö, bei der sich sehr ähnliche Symptome wie beim Verner-Morrison-Syndrom manifestieren, ist die Folge von Inselhyperplasie. Im Gegensatz zum Verner-Morrison-Syndrom ist dieser Zustand jedoch durch normale VIP-Konzentrationen charakterisiert; diese Fälle wurden von Bloom und Polak als "Pseudo-Verner-Morrison-Syndrom" bezeichnet.^{3,19} Zu anderen Tumoren als Inseltumoren, die erhöhte VIP-Konzentrationen produzieren, zählen Ganglioneuroblastome, bronchiogene Karzinome, Phäochromozytome, medulläre Schilddrüsenkarzinome und retroperitoneale Histiozytome.^{15,21-23}

3. TESTPRINZIP

VIP wird durch einen Radioimmunoassay gemessen, bei dem durch verzögerte Tracer-Zugabe die Empfindlichkeit erhöht wird. Probe und Kaninchen-anti-VIP werden hinzugegeben, gefolgt von einer 24-stündigen Inkubation bei 2-8°C. Anschließend wird ¹²⁵I-VIP hinzugegeben, gefolgt von einer zweiten 24-stündigen Inkubation bei 2-8°C. Ein zuvor präzipitierter Träger, ein zweiter Antikörper und Polyethylenglykol werden in einem einzigen Schritt hinzugegeben. Der Test kann nach mindestens 2 Stunden Inkubation bei 2-8°C zentrifugiert und dekantiert werden.

4. REAGENZIEN DES KITS

VIP-Citratpuffer	1 Fläschchen / 2 ml
VIP-Nullkalibrator	1 Fläschchen / 5 ml
VIP-Kalibratoren (0-5)	5 Fläschchen / 2 ml
VIP-Antiserum	1 Fläschchen / 12,5 ml
¹²⁵ I-VIP	1 Fläschchen / 12,5 ml
Präzipitierender Komplex (GAR-PPT)	1 Fläschchen / 35 ml
VIP-Kontrollen (Stufe 1 und 2)	2 Fläschchen / 2 ml
Anzahl der Tests	125

LAGERUNG: Nach Empfang und vor der Rekonstitution alle Reagenzien bei 2–8 °C aufbewahren. Nach der Rekonstitution sind dagegen alle Reagenzien bis zum Verfallsdatum bei höchstens –15° zu lagern. Die Reagenzien dürfen nach dem Verfallsdatum nicht verwendet werden.

Bei der Rekonstitution den Inhalt der Fläschchen vorsichtig mischen, um Schaumbildung zu vermeiden. Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

4.1 VIP-Citratpuffer: lyophilisiertes Reagenz

BSA-Citratpuffer enthält Thimerosal als Konservierungsmittel. Das Fläschchen mit 2 ml destilliertem Wasser rekonstituieren, mischen und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

4.2 VIP-Nullkalibrator: lyophilisiertes Reagenz

Citratplasma wird in BSA-Citratpuffer verdünnt, der Thimerosal und andere Stabilisatoren enthält. Das Fläschchen mit 5 ml destilliertem Wasser rekonstituieren, mischen und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

4.3 VIP-Kalibratoren: lyophilisiertes Reagenz

VIP-Kalibratoren mit Nominalkonzentrationen zwischen 25 und 400 pg/ml werden in VIP-freiem Plasma und BSA-Citratpuffer vorverdünnt. Exakte Konzentrationswerte sind auf jeder Charge angegeben. Das Fläschchen mit 2,0 ml destilliertem Wasser rekonstituieren, mischen und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen. Das Kit wird mit synthetischem VIP standardisiert. Die Kalibratoren des Kits sind mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische *in-vitro*-Test wie empfohlen durchgeführt wird.

4.4 VIP-Antiserum: lyophilisiertes Reagenz

Kaninchen-anti-VIP-Serum wird in thimerosalhaltigem BSA-Boratpuffer verdünnt. Das Fläschchen mit 12,5 ml destilliertem Wasser rekonstituieren, mischen und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

4.5 ¹²⁵I-VIP: lyophilisiertes Reagenz

VIP wird mit Jod-125 markiert und in BSA-Citrat-EDTA-Puffer verdünnt, der Thimerosal und andere Stabilisatoren enthält. Das Fläschchen mit 12,5 ml destilliertem Wasser rekonstituieren, mischen und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen; vor dem Gebrauch gründlich mischen.

4.6 Präzipitierender Komplex (GAR-PPT): lyophilisiertes Reagenz

Normales Kaninchenserum, vorpräzipitiert mit Ziege-anti-Kaninchenserum und Polyethylenglykol (PEG), wird in einem BSA-Boratpuffer verdünnt, der Thimerosal und andere Konservierungsmittel enthält. Jedes Fläschchen mit 35 ml destilliertem Wasser rekonstituieren; gründlich mischen, bis die Suspension ganz homogen ist, und dann für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen und gelegentlich umrühren.

4.7 VIP-Kontrolle (Stufe 1 und Stufe 2): lyophilisiertes Reagenz

Falls notwendig, wird defibriniertes Humanplasma mit der entsprechenden VIP-Menge versetzt, um eine Konzentration innerhalb des angegebenen Bereichs zu erzielen. Zugabe von Natriumazid als Konservierungsmittel. Jedes Fläschchen mit 2,0 ml destilliertem Wasser verdünnen, mischen und 15-20 Minuten bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen.

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK.

Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren.

REAGENZIEN MIT MATERIAL HUMANEN URSPRUNGS

Dieses Produkt ist als potenziell infektiös zu behandeln.

Alle in der Herstellung dieses Produktes verwendeten Serum- bzw. Plasmaspendeeinheiten wurden nach einer FDA-genehmigten Methode getestet und für nicht reaktiv auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Antikörper (HCV) und Antikörper für HIV-1/2 befunden. Obwohl diese Methode äußerst genau ist, bietet sie keine Gewähr dafür, dass alle infizierten Einheiten identifiziert werden können. Dieses Produkt kann auch Material humanen Ursprungs enthalten, für welches es noch kein genehmigtes Testverfahren gibt. Da keine der zur Zeit bekannten Testmethoden absolute Gewähr für die Abwesenheit des Hepatitis-B-Virus (HBV), des Hepatitis-C-Virus (HCV), des Retrovirus (HIV) oder anderer Infektionserreger bieten kann, sind alle Produkte mit Komponenten humanen Ursprungs unter Einhaltung guter Laborpraktiken und entsprechender Vorsichtsmaßnahmen laut Empfehlungen des Leitfadens im Handbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboren) (4. Auflage, Mai 1999, oder aktuelle Auflage) der Centers for Disease Control and Prevention und der National Institutes of Health (amerikanische Krankheitsforschungszentren / Staatliche Gesundheitsinstitute) beschrieben.

REAGENZIEN MIT NATRIUMAZID

ACHTUNG: Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid, das ggf. mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und höchst explosive Metallazide bilden kann. Zur Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen, um Azidbildung zu vermeiden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" des Handbuchs "Safety Management" Nr. CDC-22, herausgegeben vom Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, 1976.

Europäische Gemeinschaften: Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe (Richtlinie 1999/45/EG)

R20/21/22 - Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.

R32 - Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

S28 - Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

THIMEROSALHALTIGE REAGENZIEN

Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Thimerosal, das unter anderem auch eine Quecksilberverbindung enthält. Die Entsorgung von elementarem oder anorganischem Quecksilber sowie von Quecksilberoxiden und -komponenten muss unter strikter Einhaltung aller lokalen, einzelstaatlichen und bundesstaatlichen Vorschriften erfolgen.

ACHTUNG: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Erkenntnissen des Staates Kalifornien zu Schäden des Erbgutes sowie zu Missbildungen führen kann.

REAGENZIEN MIT IOD-125

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit höchstens 2 µCi (74 kBq) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Dieses radioaktive Material darf nur von Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Laboren oder Krankenhäusern und nur für klinische *In-vitro*-Tests oder *In-vitro*-Labortests, bei denen das Material oder dessen Strahlung keinen Menschen oder Tieren intern oder extern verabreicht wird, empfangen, erworben, besessen und verwendet werden. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung waschen. Alle benutzten Glasbehälter gründlichst mit Wasser spülen, bevor sie zusammen mit anderen Laborbehältern aus Glas ausgewaschen werden.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

VORSICHT: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien krebserregend ist.

WICHTIGER HINWEIS: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität des Kits angibt.

6. ANZEICHEN FÜR MÖGLICHEN VERFALL DER KIT-REAGENZIEN

- 6.1 Das Vorhandensein abnormer Partikel in einem der Reagenzien.
- 6.2 Eine Verschiebung der Steigung oder Position der Kalibratorkurve im Vergleich zu den normalen Ergebnissen.
- 6.3 Eine Abnahme der maximalen Bindung
- 6.4 Eine hohe nichtspezifische Bindung

7. PROBENGEWINNUNG UND VORBEREITUNG

Für den VIP-Test werden 200 Mikroliter aprotininhaltiges EDTA-Plasma in zweifacher Ausführung benötigt. Die Plasmaproben können direkt getestet werden, ohne dass eine Extraktion erforderlich ist.

Bei der anfänglichen Probengewinnung für VIP muss EDTA- und aprotininhaltiges Plasma verwendet werden.

Blut in einem evakuierten Glasröhrchen für 5 oder 10 ml unter Verwendung von EDTA als Antikoagulationsmittel sammeln. Aprotinin sollte unverzüglich zu dem Sammelröhrchen hinzugegeben werden, um einen Abbau des VIP in den Proben bei einer Konzentration von 2.500 KIU/5 ml Gesamtblut zu vermeiden. Die Proben

unverzüglich 15 Minuten lang bei 760 x g** zentrifugieren, um hämolysefreies Plasma zu erhalten. Das Serum von den Zellen trennen und in Röhrchen füllen. Wenn die Proben nicht unverzüglich verwendet werden, sollten sie bei höchstens –15 °C gelagert werden. Proben dürfen nicht wiederholt eingefroren und aufgetaut werden.

Alle Kunststoffteile, Glasteile und sonstige Materialien, die Kontakt mit den Proben haben, müssen frei von jeglichen Verunreinigungen sein.

8. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND MATERIALIEN

- 8.1 Einweg-Borosilikatglasröhrchen, 12 x 75 mm
- 8.2 Temperaturgesteuerte Zentrifuge für 12 x 75 mm-Röhrchen
- 8.3 Gammaszintillationszähler zur Zählung von Jod-125
- 8.4 Vortexer
- 8.5 Empfohlene Pipettiergeräte:
 - a. Auf die Abgabe von 100 µl und 200 µl kalibrierte Mikropipetten
 - b. Auf die Abgabe von 100 µl, 500 µl und 1 ml kalibrierte Multipipetten
- 8.6 0,85% Kochsalzlösung
- 8.7 Destilliertes Wasser

9. TESTVERFAHREN

ACHTUNG: DEN TEST AUF **CRASH-EIS** ANSETZEN. VIP IST IN BEI RAUMTEMPERATUR AUFBEWAHRTEM PLASMA LABIL; DAHER IST DIESE VORSICHTSMASSNAHME ERFORDERLICH, UM GÜLTIGE ERGEBNISSE ZU ERHALTEN.

- 9.1 Lyophilisierte Reagenzien rekonstituieren und gefrorene Reagenzien vollständig auftauen lassen. Die Reagenzien dürfen nicht auf mehr als 25°C erwärmt werden. Alle Reagenzien vor dem Gebrauch leicht mischen.
- 9.2 Markierte 12 x 75 mm-Einweg-Glasröhrchen in Zweierreihen aufstellen (siehe Testplan auf der Rückseite).
- 9.3 Reagenzien wie folgt zugeben:
 - a. **Röhrchen für die Gesamtzählung**
Bis Schritt 5 beiseite legen.
 - b. **NSB-Röhrchen**
200 µl Nullkalibrator
100 µl VIP-Citratpuffer
 - c. **Nullkalibrator**
200 µl Nullkalibrator
100 µl VIP-Antiserum
 - d. **VIP-Kalibratoren (A-E)**
200 µl VIP-Kalibrator
100 µl VIP-Antiserum
 - e. **Kontrollen und unbekannte Proben**
200 µl Plasma
100 µl VIP-Antiserum
- 9.4 Vorsichtig die Röhrchen ohne Schaumbildung vortexen und 24 Stunden ($\pm$ 2 Stunden) lang bei 2-8°C inkubieren.
- 9.5 100 µl 125I-VIP zu allen Röhrchen hinzugeben.
- 9.6 Vorsichtig die Röhrchen ohne Schaumbildung vortexen und 24 Stunden ($\pm$ 2 Stunden) lang bei 2-8°C inkubieren.
- 9.7 1 ml 0,85% Kochsalzlösung zu allen Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen hinzugeben.
- 9.8 Den GAR-PPT-Komplex gründlich mischen; 500 µl zu allen Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen hinzugeben.

** $g = (1118 \times 10^{-6}) (\text{Radius in cm}) (U/\text{Min})^2$
- 9.9 Vorsichtig die Röhrchen ohne Schaumbildung vortexen und 2 Stunden ($\pm$ 15 Minuten) lang bei 2-8°C inkubieren.

- 9.10 Die Röhrchen 20 Minuten lang bei 20–25°C mit 760 x g* zentrifugieren.
- 9.11 Die Überstände durch mindestens 2 Minuten langes Umdrehen der Röhrchen sofort aus allen Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen dekantieren. Bevor Sie die Röhrchen aufrecht stellen, die Röhrchen auf Saugpapier abtupfen, um alle eventuellen Tropfen von Überständen auf den Rändern zu entfernen.
- 9.12 Mit einem Gammazintillationszähler den Niederschlag in jedem Röhrchen und den Totalaktivität-Röhrchen mindestens 60 Sekunden lang messen. (Siehe Abschnitt "Grenzen des Verfahrens").

10. ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN

- 10.1 Alle Proben in doppelter Ausführung testen, um die gemessenen Werte zu bestätigen.
- 10.2 Jedes Aliquot des Reagenzes in das untere Drittel des Teströhrchens hinzugeben, damit sich die Reagenzien vollständig vermischen.
- 10.3 Die Einweg-Röhrchen einiger Hersteller führen zu hohen nichtspezifischen Bindungen.
- 10.4 Falls Sie es vorziehen, den Überstand vom Präzipitat abzusaugen, achten Sie dabei sorgfältig darauf, das Präzipitat nicht aufzurühren.
- 10.5 Jede Probe, deren Wert größer ist als der größte Kalibratorwert, muss mit dem Nullkalibrator verdünnt und erneut getestet werden. Das Ergebnis muss mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert werden.
- 10.6 Bei der Durchführung des Zentrifugierschritts muss die Temperatur so kontrolliert werden, dass sie 25°C nicht überschreitet.
- 10.7 Um die konsistente Leistung eines Radioimmunoassays vollständig zu überwachen, müssen möglicherweise weitere Faktoren überprüft werden. DiaSorin empfiehlt, die folgenden Parameter regelmäßig zu überprüfen, um eine konsistente Leistung des Kits sicherzustellen.
 - a. **Gesamtzählung**
 - b. **Maximale Bindung**
Durchschnittliche Zählungen pro Minute (CPM) der Nullkalibrator-Röhrchen / Durchschnittliche CPM der Totalaktivität-Röhrchen.
 - c. **Nichtspezifische Bindung**
Durchschnittliche CPM der NSB-Röhrchen / Durchschnittliche CPM der Totalaktivität-Röhrchen.
 - d. **Steigung der Kalibrator Kurve**
Z. B. Überwachung der Suppressions-Punkte 80 %, 50 % und 20 % der Kalibrator Kurve.

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte mindestens zwei Kit-Kontrollen für jeden Test vorsehen, damit die Gültigkeit der Testergebnisse überprüft werden kann. Ein Mittelwert und eine Standardabweichung sind dann für jede Kontrolle in mindestens zehn Versuchsgängen zu bestimmen. Ein zulässiger Wertebereich kann dann für diese Kontrollen mit ± 2 Standardabweichungen der zuvor bestimmten Werte ermittelt werden. Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin hat für die in diesem Kit enthaltenen Kontrollen einen Bereich festgelegt. Diese Bereiche sind auf den Fläschchen mit den Qualitätskontrollen aufgedruckt.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{Radius in cm}) (\text{U/Min})^2$$

12. ERGEBNISBERECHNUNG

Es gibt viele Möglichkeiten, die Ergebnisse von Radioimmunoassays zu berechnen. Bei jeder Methode wird eine Kalibratorkurve angelegt, indem die prozentualen Bindungen gegen die angegebenen Konzentrationen der Kalibrations-Kalibratoren aufgetragen werden. Die Kurve kann entweder eine lineare oder eine logarithmische Skala haben. Jede dieser Methoden führt im Wesentlichen zu denselben Werten für Kontrollen und Proben; bei einigen Tests ist die eine Methode jedoch möglicherweise besser geeignet als die andere. Die Umrechnungsmethode für das DiaSorin-Qualitätskontrolllabor lautet % B/B₀ gegen log Konzentration.

- 12.1** Die durchschnittlichen CPM für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und jede unbekannte Probe berechnen.
- 12.2** Die durchschnittlichen CPM der NSB-Röhrchen von allen Zählungen abziehen.
- 12.3** Den korrigierten CPM-Wert für jeden Kalibrator, jede Kontrolle oder jede Patientenprobe durch den korrigierten CPM-Wert des Nullkalibrators dividieren.

$$\frac{\text{CPM des Kalibrators oder der unbekannten Probe} - \text{CPM der NSB}}{\text{CPM des Nullkalibrators} - \text{CPM der NSB}} \times 100$$

- 12.4** Auf halblogarithmischem Millimeterpapier (2 Zyklen) oder doppeltlogarithmischem Millimeterpapier prozentuale Bindungen B/B₀ für die VIP-Kalibratoren (vertikale Achse) gegen die Konzentration (horizontale Achse) auftragen.
- 12.5** Durch die Punkte eine Ausgleichsgerade legen.
- 12.6** Die VIP-Konzentrationen in den unbekannten Proben aus der Auftragung interpolieren.
- 12.7** Wenn eine unbekannte Probe verdünnt wurde, muss der Wert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert werden.
- 12.8** Die maximale Bindung wird berechnet, indem die CPM des Nullkalibrators durch die in den Totalaktivität-Röhrchen erhaltenen Gesamtzählungen dividiert wird.

TABELLE III
DiaSorin VIP RIA-Probendaten

Röhrchen	Doppelter I/M	Durchschn. I/M	Korrigierter I/M	Prozent Gebunden (B/T)	Prozent (B/B ₀)	Konz. (pg/ml)
Gesamtzählung	10.928 10.931	10.930				
NSB	808 1,055	932		8,5		
Nullkalibrator	4.603 4.834	4.709	3.777	43,1	100,0	
Kalibratoren (pg/ml)						
A (19)	4.034 4.058	4.046	3.114		82,5	
B (30)	3.542 3.573	3.558	2.626		69,5	
C (54)	2.768 2.766	2.767	1.835		48,8	
D (140)	1.948 2.028	1.988	1.056		28,0	
E (290)	1.297 1.408	1.352	420		11,1	
Unbekannte Proben						
1	2.051 2.070	2.060	1.128		29,9	126
2	3.210 3.207	3.209	2.277		60,3	40

Typische Probendaten und eine Kalibratorokurve sind in TABELLE III und in ABBILDUNG 1 dargestellt; diese Informationen dienen nur als Referenz und dürfen nicht zur Berechnung von Werten verwendet werden.

VIP-BEISPIELKALIBRATORKURVE

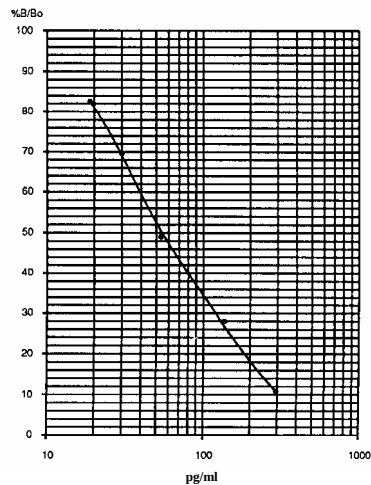


ABBILDUNG 1

Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin verwendet eine geglättete Spline-Kurvenanpassung.

13. GRENZEN DES VERFAHRENS

- 13.1 Wenn die ursprüngliche Konzentration der unbekannten Probe größer ist als der größte Kalibratorwert, ist diese Probe nur mit Nullkalibrator zu verdünnen.
- 13.2 Proben dürfen nicht wiederholt eingefroren und aufgetaut werden.
- 13.3 Die Zählzeiten sollten ausreichend lang sein, um statistische Fehler zu vermeiden (2.000 CPM ergeben z. B. 5 % Fehler; 10.000 CPM ergeben 1 % Fehler).

14. ERWARTETE WERTE

KLINISCHE INTERPRETATION VON WERTEN

Zur Plasma-VIP-Bestimmung wurden 45 normale nüchterne Personen (Durchschnittsalter 28 Jahre) getestet. Bei den 21 männlichen Personen lag der Wert bei $42,8 \pm 11,9$ pg/ml VIP (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) und bei den 24 weiblichen Personen bei $42,6 \pm 7,2$ pg/ml. Da zwischen den Werten für männliche und weibliche Personen kein bedeutender Unterschied besteht, beträgt der Gesamtdurchschnitt $42,7 \pm 9,5$ pg/ml bei nüchternen Erwachsenen. Ein vorläufiger Bereich mit zwei Standardabweichungen wäre 23-63 pg/ml. Dieser Normalbereich ist möglicherweise größer, wenn Personen aus einer Krankenhauspopulation mit Magen-Darm-Erkrankungen als Kontrollgruppe dienen. Bei anderen Tests wird der Normalbereich mit bis zu 200 pg/ml angegeben. Der Normalbereich beim Test der Ohio State University ist bis 170 pg/ml nicht erkennbar, wobei der Durchschnitt bei 62 ± 44 pg/ml liegt. Da beim Ohio State-Test Werte unter 50 als nicht erkennbar angegeben werden, besitzt dieser Test eine geringere Empfindlichkeit als das DiaSorin-Verfahren. Eine Serie von klinischen Doppelblindproben,* einschließlich mehrerer VIPome und Ganglioneuroblastome, wurde von Dr. Thomas O'Dorisio an der Ohio State University erhalten. Später gab er seine Ergebnisse zu diesen Proben bekannt, die in TABELLE IV dargestellt sind. Die Daten zeigen viele extrem erhöhte VIP-Werte, ein charakteristisches Merkmal für VIP-produzierende Tumore, und belegen, dass mit dem DiaSorin-VIP-Kit tatsächlich erhöhte Werte bei Menschen gemessen werden können und dass dieses Kit im Vergleich zu einem etablierten Forschungslabor gut abschneidet. Die Regressionsgleichung für die ersten 22 Proben (mit Ausnahme der von Ohio State berichteten 4 Normalpersonen mit nicht erkennbaren Konzentrationen) beträgt $y = 0,78x + 32$, wobei y der DiaSorin-Wert und x der Ohio State-Wert ist. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,94. Die im Ohio State-Labor verwendeten Kontrollproben wurden ebenfalls mit dem DiaSorin-Kit gemessen. Die niedrige Kontrolle dieser Proben (Ohio State-Bereich: <50-100 pg/ml) wies einen Mittelwert von 53 pg/ml auf, und für die hohe Kontrolle (Ohio State-Bereich: 450-1.014 pg/ml) wurde bei 3 getrennten Analysen mit dem DiaSorin-Kit ein Wert von 1.077 pg/ml ermittelt. Mehrere dieser Ohio State-Proben von Normalpersonen wiesen beim DiaSorin-Test Werte zwischen 65 und 176 pg/ml auf. Der große Bereich von pathologischen Proben beim WDHA-Syndrom ist in der Literatur typisch und ähnelt sehr der Situation von Gastrinkonzentrationen in Gastrinomen.

* Diese Proben waren für einen unbekannten Zeitraum im Labor von Dr. O'Dorisio aufbewahrt worden. Der Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit des Einfrierens und Auftauens zwischen der Ohio State- und der DiaSorin-Analyse ist nicht bekannt.

TABELLE IV
Ergebnisse von getrennten Doppelblindproben von
Dr. Thomas O'Dorisio an der Ohio State University
Werte: Pikogramm/ml

Fall	VIP DiaSorin	VIP Ohio State	Kommentare
I. Ganglioneuroblastom			
1	1888	1700	symptomatisch für WDHA
1A	248	135	asymptomatisch
1B	464	430	symptomatisch für WDHA
2	3776	>2000	
2A	4672	1700	
2B	352	225	nach Resektion bei Diarrhö
II. VIPom			
1	368*	960	
1A	184	290	nach Resektion
2	1152	1200	metastatisch
3	304	290	metastatisch nach Resektion
4	208	230	nach Resektion
III. Wässrige Diarrhö mit undokumentierter Diagnose			
1	11250	>14500	
2	368	185	
3	928	880	neg. Untersuchung
IV. Wässrige Diarrhö bei anderen Tumoren			
1	192	390	Hypernephrom
2	2360	1500	kleinzelliges Karzinom
3	208	330	Hypernephrom mit Vasodilation
4	272	360	Pheochromozytom
V. Normalpatienten			
1	64	<50	
2	96	<50	
3	104	<50	
4	96	<50	
5	176	110	
VI. Unbekannt			
1	720	1150	
2	512	1200	
3	320	170	

* Der DiaSorin-Test wurde nach mehreren Gefrier-Auftau-Zyklen durchgeführt.

** Regressionsanalyse mit Ausnahme von <50 Paaren; $y = 0,79x + 335$; $r = 0,94$;
 y = DiaSorin-VIP; x = Ohio State-VIP

15. SPEZIELLE LEISTUNGSMERKMALE

15.1 Präzision

Intra-Testvarianz (Werte = 5)

Probennummer	Mittelwert	SA	% VK
Niedrig	62,6	1,2	1,9
Hoch	87,8	2,6	3,0

Inter-Testvarianz (Werte = 73)

Probennummer	Mittelwert	SA	% VK
Niedrig	56,3	5,4	9,58
Hoch	80,4	5,7	7,07

15.2 RICHTIGKEIT: DIE RICHTIGKEIT DES ASSAYS WURDE MIT HILFE DES VERDÜNNUNGS- UND DES WIEDERFINDUNGSTESTS ÜBERPRÜFT.

Linearität (Parallelität)

Serienverdünnung von 5 Patientenproben (Werte = pg/ml)

Probennummer	1/8	1/16	1/32
1	1584	1696	1888
2	3040	4192	4672
3	>3200	3440	3776
	1/10	1/15	1/20
4	2630	2130	2360
	1/100	1/150	1/200
5	7200	11250	10400

Wiederfindung (Genauigkeit) (Werte = pg/ml)

TABELLE V

VIP-Wiederfindungen bei verschiedenen sich dem Normalbereich nähernden Konzentrationen aus frischem EDTA- und aprotininhaltigem Plasma (Jeder Punkt stellt den Mittelwert von zweifachen Analysen dar.)

Plasma probe	VIP hinzuge geben (pg/ml)	VIP ermittelt (pg/ml)	Wiederfi ndung %	VIP- Plasma probe	VIP hinzugeg eben (pg/ml)	VIP ermittelt (pg/ml)	Wiederfi ndung %
1	0	14	--	3	0	14	--
	25	38	97		25	33	85
	50	50	78		50	48	75
	100	85	75		100	86	75
2	0	2	--	4	0	14	--
	25	23	85		25	38	90
	50	48	92		50	50	75
	100	80	78		100	80	68
			Durchsch n. Wiederfi ndung	25 50 100	89% 80% 74%		

15.3 Analytische Sensitivität

Wenn die geringste nachweisbare Konzentration als die scheinbare Konzentration bei 3 Standardabweichungen von den Zählungen bei maximaler Bindung definiert wird, beträgt sie 1,0 pg/Röhrchen (5 pg/ml).

15.4 Analytische Spezifität

Der Vergleich der Kreuzreaktivität des VIP-Antikörpers wurde mit den folgenden Peptiden durchgeführt:

Peptide	% Kreuzreaktivität
Somatostatin	<0,1
pMotilin	<0,1
pGastrisches inhibitorisches Polypeptid (GIP)	<0,1
Glukagon	<0,1
pGastrin-freisetzendes Peptid (GRP)	<0,1
Gastrin ¹⁷ I	<0,1
Gastrin ³⁴ I	<0,1
pSekretin	<0,1
hPankreatisches Polypeptid (PPP)	<0,1
hProinsulin	<0,1
pInsulin	<0,1
Cholecystokinin (CCK8)	<0,1
Substanz P	<0,1
Neurotensin	<0,1
Methionin-Enkephalin	<0,1
Leucin-Enkephalin	<0,1
Bombesin	<0,1

LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE

TESTSCHEMA

1. VORSICHT: Den Test auf Crash-Eis ansetzen. VIP ist in bei Raumtemperatur aufbewahrt Plasma stabil; daher ist diese Vorsichtsmaßnahme erforderlich, um gültige Ergebnisse zu erhalten.
2. Lyophilisierte Reagenzien rekonstituieren und gefrorene Proben vollständig auftauen lassen. Die Reagenzien dürfen nicht auf mehr als 25 °C erwärmt werden. Röhrchen in doppelter Anordnung kennzeichnen.
3. Reagenzien wie folgt dispensieren:

Röhrchen/Reagenzien	Totala ktivität	NSB	Kal 0-5	Kontrollen und unbekannte Proben
VIP-Citratpuffer	-	100 µl	200 µl	-
Kalibratoren (0-5)	-	200 µl	200 µl	-
Kontrollen	-	-	-	200 µl
Unbekannte Proben	-	-	-	200 µl
Antiserum	-	-	100 µl	100 µl

4. Die Röhrchen mit Parafilm abdecken und vorsichtig schütteln.
5. 24 Stunden +/- 2 Stunden lang bei 2-8°C inkubieren.
6. 100 µl des Tracers in alle Wells dispensieren.
7. Abdecken und vorsichtig schütteln.
8. 24 Stunden +/- 2 Stunden lang bei 2-8°C inkubieren.
9. 1 ml 0,85% Kochsalzlösung in alle Wells außer den Totalaktivität-Röhrchen dispensieren.
10. 500 µl GAR-PPT in alle Wells mit Ausnahme der Totalaktivität-Röhrchen dispensieren.
11. Die Röhrchen abdecken und vorsichtig vortexen.
12. 2 Stunden +/- 15 Minuten lang bei 2-8°C inkubieren.
13. 20 Minuten lang mit 760 x g* zentrifugieren.
14. Die Überstände dekantieren.
15. Jedes Röhrchen mindestens 60 Sekunden lang in einem Gamma-Zähler zählen.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{Radius in cm}) (U/\text{min})^2$$

ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA DI PEPTIDE VASOATTIVO INTESTINALE (VIP)

1. USO PREVISTO

PER USO DIAGNOSTICO/IN VITRO .

Questo kit serve per la determinazione quantitativa di peptide vasoattivo intestinale (VIP) nel plasma mediante analisi radioimmunologica (RIA).

2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

Il peptide vasoattivo intestinale è un composto di 28 amino acidi originariamente estratto dall'intestino tenue del maiale.^{1,2} La sua sequenza di amino acidi, confrontata con diversi peptidi affini, è la seguente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
VIP	His-	Ser-	Asp-	Ala-	Val-	Phe-	Thr-	Asp-	Asn-	Tyr-	Tyr-	Arg-	Leu-	Arg
Secretina	His-	Ser-	Asp-	Gly-	Thr-	Phe-	Thr-	Ser-	Glu-	Leu-	Ser-	Arg-	Leu-	Arg
Glucagone	His-	Ser-	Gln-	Gly-	Thr-	Phe-	Thr-	Ser-	Asp-	Tyr-	Ser-	Lys-	Tyr-	Leu
GIP	Tyr-	Ala-	Gln-	Gly-	Thr-	Phe-	Ile-	Ser-	Asp-	Tyr-	Ser-	Lys-	Ala-	Met

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
VIP	Lys-	Gln-	Met-	Ala-	Val-	Lys-	Lys-	Tyr-	Leu-	Asn-	Ser-	Ile-	Leu-	Asn (NH ₂)
Secretina	Asp-	Ser-	Ala-	Arg-	Leu-	Gln-	Asp-	Leu-	Leu-	Gln-	Gly-	Leu-	Val	
Glucagone	Asp-	Ser-	Arg-	Arg-	Ala-	Gln-	Asp-	Phe-	Val-	Gln-	Trp-	Leu-	Met-	Asn-Thr
GIP	Asp-	Lys-	Ile-	Arg-	Gln-	Gln-	Asp-	Phe-	Val-	Asn-	Trp-	Leu-	Leu-	Ala-etc.

Esistono similitudini fra la regione terminale aminica di VIP e le regioni terminali amiche della secretina, glucagone e il polipeptide inibitorio gastrico (GIP). La regione terminale carbossilica (ad esempio, residui 15-28), tuttavia, è molto diversa.

Il VIP compare diffusamente in tutto il tratto gastrointestinale, dove Bloom e Polak hanno notato concentrazioni tissutali di VIP superiori rispetto a qualsiasi altro peptide intestinale.³ Gli effetti periferici di VIP nell'intestino comprendono: maggiore flusso di succhi alcalinici dal pancreas¹, inibizione della produzione di acido gastrico^{4,5}, stimolazione del rilascio di insulina⁶, iperglicemia risultante da glicogenolisi⁷, stimolazione di succhi nell'intestino tenue e maggiore adenosinmonofosfato ciclico (cAMP) nell'intestino.^{8,9}

Il VIP si trova inoltre in concentrazione elevata in tutto il sistema nervoso centrale, dove ha forti effetti vasodilatatori e ipotensivi sul sistema cardiovascolare, e nell'apparato respiratorio dove condiziona la broncodilatazione e aumenta la ventilazione.¹⁰ Il VIP si trova sia nei neuroni sia nelle cellule endocrine, sebbene sia predominante nei neuroni, e sembra essere rilasciato dalla stimolazione neuronale.¹⁰⁻¹⁴

La misurazione di VIP serve per individuare certi tipi di tumori degli isolotti pancreatici che secernono quantità eccessive del peptide. Questa condizione è stata definita come sindrome di Verner-Morrison¹⁵ ed è caratterizzata da diarrea acquosa refrattaria, ipocaliemia ed acloridria (sindrome di WDHA). I soggetti affetti da questa sindrome presentano livelli molto elevati di VIP nel plasma, spesso migliaia di volte la concentrazione normale.¹⁶⁻¹⁸ Un'altra forma di diarrea, che si manifesta con sintomi molto simili a quelli della sindrome di Verner-Morrison, è il risultato di iperplasia degli isolotti. A differenza della sindrome di Verner-Morrison, tuttavia, questa condizione è caratterizzata da livelli normali di VIP; questi casi sono stati definiti da Bloom e Polak come pseudo-sindrome di Verner-Morrison.^{3,19} Tumori diversi da quelli dell'isolotto che producono livelli elevati di VIP comprendono: neuroblastoma del ganglio, carcinoma broncogenico, feocromocitoma, carcinoma tiroideo midollare ed istiocitoma retroperitoneale.^{15,21-23}

3. PRINCIPIO DELL'ANALISI

Il VIP viene misurato mediante analisi radioimmunologica che utilizza l'aggiunta ritardata di tracciante per aumentare la sensibilità. Dopo l'aggiunta di campione e di siero coniglio anti-VIP, ha luogo una incubazione di 24 ore a 2-8°C. Viene quindi aggiunto ¹²⁵I VIP, a cui fa seguito una seconda incubazione di 24 ore a 2-8°C. Il carrier pre-precipitato, il secondo anticorpo e polietilene glicolico vengono aggiunti in un'unica operazione. Il composto può essere centrifugato e decantato dopo un'incubazione minima di due ore a 2-8°C.

4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

Tampone citrato VIP	1 fiala/2 mL
Calibratore 0 VIP	1 fiala/ 5 ml
Calibratori VIP (0-5)	5 fiale/2 ml
Antisiero VIP	1 fiala/12,5 mL
¹²⁵ I VIP	1 fiala/12,5 mL
Complesso precipitante (GAR-PPT)	1 fiala/35 mL
Controlli VIP (Livello 1 e 2)	2 fiale/2 ml
Numero di test	125

CONSERVAZIONE: Dopo il ricevimento dei reagenti e prima della ricostituzione, conservarli a 2-8°C. Dopo la ricostituzione, conservare tutti i reagenti a -15° o a una temperatura inferiore, fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. I reagenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza.

Durante la ricostituzione del contenuto delle fiale, mescolare delicatamente al fine di evitare la formazione di schiuma. Non si devono mescolare reagenti di lotti diversi.

4.1 Tampone citrato VIP: reagente liofilizzato

Il tampone BSA-citrato contiene timerosal come conservante. Ricostituire la fiala con 2 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso.

4.2 Calibratore 0 VIP: reagente liofilizzato

Il plasma citrato è diluito in un tampone BSA-citrato contenente timerosal ed altri stabilizzanti. Ricostituire la fiala con 5 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso.

4.3 Calibratori VIP: reagente liofilizzato

I calibratori VIP, a concentrazioni nominali varianti fra 25-400 pg/mL, sono prediluiti nel plasma privo di VIP e nel tampone BSA-citrato. I valori esatti della concentrazione sono assegnati per ogni lotto. Ricostituire ogni fiala con 2,0 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso. Questo kit è standardizzato con VIP sintetico. Il calibratore dimostra commutabilità con i campioni del paziente quando usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico *in vitro*, come consigliato.

4.4 Antisiero VIP: reagente liofilizzato

Il siero coniglio anti-VIP è diluito in un tampone BSA-borato contenente timerosal. Ricostituire la fiala con 12,5 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso.

4.5 ¹²⁵I VIP: reagente liofilizzato

Il VIP è etichettato con iodio-125 e diluito in un tampone BSA-citrato-EDTA contenente timerosal ed altri stabilizzanti. Ricostituire la fiala con 12,5 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso.

4.6 Complesso precipitante (GAR-PPT): reagente liofilizzato

Il siero normale di coniglio, pre-precipitato con siero capra anti-coniglio e polietilene glicolico (PEG), è diluito in un tampone BSA-borato contenente timerosal ed altri conservanti. Ricostituire ogni fiala con 35 mL di acqua purificata; agitare bene fino a quando la sospensione si presenta omogenea e lasciare riposare per almeno 30 minuti a temperatura ambiente agitando di tanto in tanto.

4.7 Controllo VIP (livello 1 e livello 2): reagente liofilizzato

Nel plasma umano defibrinato si aggiunge, se necessario, una quantità necessaria di VIP in modo da ottenere una concentrazione nei range specificati. Viene aggiunta sodio azide come conservante. Ricostituire ogni fiala con 2,0 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

SOLTANTO PER USO DIAGNOSTICO/IN VITRO .

Non per uso interno o esterno su animali o persone.

REAGENTI CONTENENTI MATERIALE DI PROVENIENZA UMANA

Trattare come potenzialmente infettivi.

Ogni unità di siero/plasma da donatore usata nella preparazione di questo prodotto è stata testata con una metodica approvata dalla FDA statunitense e trovata non reattiva per la presenza di HBsAg, anticorpi a HCV e anticorpi ad HIV 1/2. Anche se questi metodi sono estremamente accurati, non è garantita la localizzazione di tutte le unità infette. Questo prodotto può inoltre contenere altro materiale di provenienza umana per il quale non esiste un test approvato. Poiché nessuna metodologia di test approvata può offrire garanzia completa sull'assenza del virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV), del virus di immunodeficienza umana (HIV) o di altri agenti infettivi, tutto il materiale di provenienza umana deve essere trattato in conformità con le buone pratiche di laboratorio adottando le precauzioni appropriate come descritto nei manuali dei Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," quarta edizione, Maggio 1999 o edizione corrente.

REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE

ATTENZIONE: Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con componenti in piombo o rame e formare quindi azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con abbondante acqua al fine di evitare la formazione di azide. Per ulteriori informazioni, consultare "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," nel manuale Guide-Safety Management No. CDC-22 pubblicato dai Centri per il controllo e la Prevenzione delle malattie di Atlanta, GA, 1976.

Frasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Dannoso per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas (Il contatto con acidi libera gas altamente tossico).

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water (Dopo il contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua).

REAGENTI CONTENENTI TIMEROSAL

Alcuni reagenti di questo kit contengono timerosal in cui è presente un composto di mercurio. Lo smaltimento del mercurio allo stato di elemento, inorganico, di ossidi di mercurio e composti di mercurio deve essere effettuato in piena conformità con tutte le normative locali, statali e federali.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare difetti congeniti o altre lesioni ai feti.

REAGENTI CONTENENTI IODIO-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 2µCi (74kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria,

laboratori clinici o ospedali e unicamente per test *in vitro* clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare cancro.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

6. INDICAZIONI DI POSSIBILE DETERIORAMENTO DEI REAGENTI DEL KIT

- 6.1 La presenza di particolato anomalo in uno qualsiasi dei reagenti.
- 6.2 Uno sfasamento nella pendenza o posizione della curva di calibrazione rispetto a quella che normalmente si ottiene.
- 6.3 Una diminuzione del legame massimo.
- 6.4 Un legame altamente non specifico.

7. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Sono richiesti duecento (200) microlitri, in due serie, di plasma EDTA plasma contenente aprotinina, da usare per l'analisi VIP. I campioni di plasma possono essere analizzati direttamente, senza alcuna estrazione.

L'uso di plasma contenente EDTA e aprotinina è necessario nella raccolta iniziale del campione per VIP.

Prelevare sangue in una provetta di vetro sotto vuoto da 5 mL o 10 mL usando EDTA come anticoagulante. Aggiungere immediatamente aprotinina nella provetta per evitare il degrado di VIP nei campioni in concentrazione di 2,500 KIU/5 mL di sangue intero. Centrifugare immediatamente i campioni per 15 minuti a 760 x g** per ottenere plasma senza emolisi. Separare il siero dalle cellule e disporlo nelle provette per la conservazione. Se i campioni non vengono utilizzati immediatamente, conservarli a -15°C o a temperatura inferiore. I campioni non devono essere congelati e scongelati più volte.

Tutto il materiale in plastica, oggetti in vetro o altro materiale che viene a contatto con i campioni deve essere completamente esente da qualsiasi contaminazione.

8. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI, NON FORNITI IN DOTAZIONE

- 8.1 Provette in vetro borosilicato monouso, 12 x 75 mm.
- 8.2 Centrifuga a temperatura controllata adatta per 12 provette da 75 mm.
 $**g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$
- 8.3 Contatore ad emissione di scintille gamma adatto per il conteggio di iodio-125.

- 8.4 Mixer Vortex.
- 8.5 Dispositivi consigliati per operazioni con pipetta:
 - a. Micropipette calibrate per erogare 100 µL e 200 µL.
 - b. Dosatori a ripetizione, calibrati per erogare 100 µL, 500 µL e 1 mL.
- 8.6 Soluzione salina allo 0,85%.
- 8.7 Acqua purificata.

9. PROCEDURA DI ANALISI

ATTENZIONE: PREPARARE L'ANALISI SU **GHIACCIO TRITATO**. IL VIP È LABILE NEL PLASMA SE CONSERVATO A TEMPERATURA AMBIENTE; PERTANTO, QUESTA PRECAUZIONE È NECESSARIA PER OTTENERE RISULTATI VALIDI.

- 9.1 Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciar scongelare completamente eventuali reagenti congelati. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 25°C. Mescolare delicatamente tutti i reagenti prima dell'uso.
- 9.2 Preparare ed etichettare due serie di 12 provette monouso da 75 mm in base allo Schema di analisi sul retro della copertina.
- 9.3 Aggiungere i reagenti come indicato di seguito:
 - a. **Provette per il conteggio totale**
Lasciare da parte fino al punto 5
 - b. **Provette per legame non specifico (NSB)**
200 µL di Calibratore 0
100 µL di tampone citrato VIP
 - c. **Calibratore 0**
200 µL di Calibratore 0
100 µL di antisiero VIP
 - d. **Calibratori VIP (A-E)**
200 µL di calibratore VIP
100 µL di antisiero VIP
 - e. **Controlli e campioni non noti**
200 µL di plasma
100 µL di antisiero VIP
- 9.4 Agitare lentamente le provette nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 24 ore (± 2 ore) a 2-8°C.
- 9.5 Aggiungere 100 µL di 125I VIP in tutte le provette.
- 9.6 Agitare lentamente le provette nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 24 ore (± 2 ore) a 2-8°C.
- 9.7 Aggiungere 1 mL di soluzione salina all'0.85% in tutte le provette, eccetto le provette per il conteggio totale.
- 9.8 Agitare energicamente il complesso GAR-PPT; aggiungere 500 µL in tutte le provette, eccetto le provette per il conteggio totale.
- 9.9 Agitare lentamente le provette nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 2 ore (± 15 minuti) a 2-8°C.
- 9.10 Centrifugare le provette a 1600 x g* per 20 minuti a 20-25°C.
- 9.11 Far decantare immediatamente i liquidi superficiali da tutte le provette, eccetto le provette per il conteggio totale, capovolgendole per un periodo minimo di due minuti. Asciugare le provette con carta assorbente per eliminare eventuali gocce di liquidi superficiali prima di riportare le provette in posizione verticale.
- 9.12 In un contatore ad emissione di scintille gamma, contare il precipitato di ogni provetta e le provette per il conteggio totale per 60 secondi o più (vedere: Limiti della procedura).

** $g = (1118 \times 10^{-6}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$

10. COMMENTI ALLA PROCEDURA

- 10.1 Analizzare tutti i campioni in duplice serie per garantire l'affidabilità dei valori ottenuti.
- 10.2 Aggiungere ogni aliquota di reagente al terzo inferiore della provetta di analisi al fine di garantire una miscela completa di reagenti.
- 10.3 Alcune provette monouso determinano legami non specifici elevati.
- 10.4 Se si decide di aspirare il liquido superficiale dal precipitato, fare attenzione a non smuovere quest'ultimo.
- 10.5 Se un campione dà una lettura maggiore rispetto al calibratore superiore, il campione dovrà essere diluito con il calibratore 0 e analizzato nuovamente. Correggere il risultato con il fattore di diluizione idoneo.
- 10.6 Durante la centrifugazione, controllare la temperatura in modo che non ecceda i 25°C.
- 10.7 Per un monitoraggio completo della costanza di performance di un'analisi RIA, si possono controllare altri fattori. DiaSorin consiglia di controllare i seguenti parametri per garantire prestazioni costanti del kit:
 - a. **Conteggi totali**
 - b. **Legame massimo**
Conteggi medi al minuto (CPM) delle provette del calibratore 0/CPM medio delle provette per il conteggio totale.
 - c. **Legame non specifico**
CPM medio delle provette NSB/CPM medio delle provette per il conteggio totale.
 - d. **Pendenza della curva di calibrazione**
Ad esempio, monitorare i punti di soppressione a 80, 50 e 20% della linea del calibratore.

11. CONTROLLO DI QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe includere almeno due campioni di controllo di ogni analisi per garantire la validità dei risultati. Determinare quindi la deviazione media e standard per ogni controllo usando un minimo di dieci analisi. Si può quindi ottenere un range accettabile di valori per questi controlli utilizzando ± 2 deviazioni standard dei valori determinati in precedenza. Il Laboratorio di Controllo della Qualità DiaSorin ha stabilito un range per i controlli inclusi nel kit. I range sono stampati sulle fiale per il controllo di qualità.

12. CALCOLO DEI RISULTATI

Esistono molti metodi per calcolare i risultati di RIA, ognuno tende ad ottenere una curva di calibrazione mediante tracciamento dell'estensione del legame rispetto alle concentrazioni indicate dei calibratori. Il grafico può essere su scala lineare o logaritmica. Ciascun metodo dà essenzialmente gli stessi valori per i controlli e i campioni, anche se certe analisi possono essere più "adatte" per un particolare metodo rispetto ad un altro. Il metodo di calcolo del Laboratorio di controllo qualità di DiaSorin è % di B/B_0 rispetto alla concentrazione di log.

- 12.1 Calcolare il CPM medio per ogni calibratore, controllo e campione non noto.
- 12.2 Sottrarre il CPM medio delle provette NSB da tutti i conteggi.
- 12.3 Dividere il CPM corretto di ogni calibratore, controllo o campione per il CPM corretto del calibratore 0.

$$\frac{B/B_0 (\%)}{\text{CPM del calibratore 0 - CPM di NSB}} = \frac{\text{CPM del calibratore o campione non noto - CPM di NSB}}{\text{CPM del calibratore 0 - CPM di NSB}} \times 100$$

- 12.4 Utilizzando carta millimetrata per modello log-logit o semi-logaritmica a due cicli, tracciare la percentuale di B/B_0 per i calibratori VIP (asse verticale) rispetto alla concentrazione (asse orizzontale).
- 12.5 Tracciare una linea di miglior interpolazione fra i punti.

12.6 Interpolare i livelli di VIP nei campioni non noti.

12.7 Se un campione non noto è stato diluito, correggere con il fattore di diluizione idoneo.

12.8. Calcolare il legame massimo dividendo il CPM del calibratore 0 per la media dei conteggi totali ottenuta nelle provette dei conteggi totali.

Tabella III
Dati campione DiaSorin VIP RIA

Provetta	CPM in duplicato	CPM medio	CPM corretto	Percentuale Legato (B/T)	Percent. (B/B ₀)	Conc. (pg/mL)
Conteggio totale	10.928 10.931	10.930				
NSB	808 1.055	932		8,5		
Calibratore 0	4.603 4.834	4.709	3.777	43,1	100,0	
Calibratori (pg/mL)						
A (19)	4.034 4.058	4.046	3.114		82,5	
B (30)	3.542 3.573	3.558	2.626		69,5	
C (54)	2.768 2.766	2.767	1.835		48,8	
D (140)	1.948 2.028	1.988	1.056		28,0	
E (290)	1.297 1.408	1.352	420		11,1	
Campioni non noti						
1	2.051 2.070	2.060	1.128		29,9	126
2	3.210 3.207	3.209	2.277		60,3	40

I dati di campioni tipici e una curva di calibrazione sono riportati nella TABELLA III e nella FIGURA I; queste informazioni servono solo a scopo di riferimento e non devono essere usate per il calcolo dei valori.

ESEMPIO DI CURVA DI CALIBRAZIONE VIP

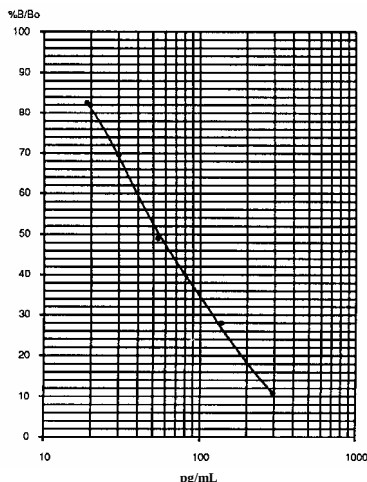


Figura 1

Il Laboratorio di controllo di qualità DiaSorin utilizza una retta curvilinea uniforme.

13. LIMITI DELLA PROCEDURA

- 13.1** Se la concentrazione iniziale del campione non noto è maggiore del calibratore superiore, diluire solo con il Calibratore 0.
- 13.2** I campioni non devono essere congelati e scongelati più volte.
- 13.3** Il conteggio delle volte dovrebbe essere sufficiente per prevenire errori statistici (ad esempio, l'accumulo di 2.000 CPM produrrà un errore del 5%; 10.000 CPM produrrà un errore dell'1%).

14. VALORI PREVISTI

INTERPRETAZIONE CLINICA DEI VALORI

Per la determinazione di VIP nel plasma sono stati prelevati campioni da 45 persone normali a digiuno (età media 28 anni). Il valore di VIP in 21 uomini era $42,8 \pm 11,9$ pg/mL ($\pm$ deviazione standard media), mentre in 24 donne era $42,6 \pm 7,2$ pg/mL. Poiché non c'è differenza significativa fra i valori degli uomini e delle donne, la media generale è di $42,7 \pm 9,5$ pg/mL negli adulti a digiuno. Un range sperimentale a due deviazioni standard potrebbe essere 23-63 pg/mL. Questo range normale può essere più ampio se si impiegano come gruppo di controllo pazienti di un ospedale non affetti da malattie gastrointestinali. Altre fonti riferiscono di un range normale fino a 200 pg/mL. Il range normale nelle analisi compiute presso l'Ohio State University è non rilevabile fino a 170 pg/mL, con una media di 62 ± 44 pg/mL. Poiché le analisi dell'Ohio State indicano valori al di sotto di 50 come non rilevabili, le loro analisi non possono considerarsi sensibili al pari della procedura stabilita da DiaSorin.

Una serie di campioni clinici a doppio cieco,* comprendenti diversi VIPoma e neuroblastoma del ganglio, sono stati raccolti dal Dr. Thomas O'Dorisio della Ohio State University. Successivamente, il Dott. O'Dorisio ha reso noto i suoi risultati sugli stessi campioni qui riportati nella TABELLA IV. I dati dimostrano molti valori VIP estremamente elevati, che sono caratteristici di tumori che producono VIP, e dimostrano che il kit VIP DiaSorin misura efficacemente valori elevati negli uomini ed è perfettamente affidabile secondo un noto laboratorio di ricerca. L'equazione di regressione per i primi 22 campioni (escludendo i 4 normali con livelli non rilevabili riportati dall'Ohio State) è $y = 0,78x + 32$, dove y è il valore di DiaSorin ed x il valore dell'Ohio State. Il coefficiente di correlazione è 0,94. Anche i campioni di controllo usati nel laboratorio Ohio State sono stati misurati con il kit DiaSorin. Il loro controllo inferiore (range dell'Ohio State <50-100 pg/mL) presentava un valore medio di 53 pg/mL,

mentre il controllo superiore (range dell'Ohio State 450-1014 pg/mL) è stato notato essere 1077 pg/mL in 3 analisi separate con il kit DiaSorin. Diversi campioni dell'Ohio State prelevati da individui normali presentavano valori variabili fra 65 e 176 pg/mL con l'analisi DiaSorin. L'ampio range di campioni patologici nella sindrome WDHA è tipico nella letteratura medica e molto simile ai livelli di gastrina nel gastrinoma.

* Questi campioni sono stati conservati per un tempo non noto nel laboratorio del Dott. O'Dorisio. Il numero di congelamento e scongelamento fra le loro analisi e le nostre analisi non è noto.

TABELLA IV

Risultati di campioni divisi a doppio cieco
i valori del Dr. Thomas O'Dorisio della Ohio State
University: picogrammi/mL

Caso	VIP DiaSorin	VIP Ohio State	Commenti
I. Neuroblastoma del ganglio			
1	1888	1700	WDHA sintomatico
1A	248	135	asintomatico
1B	464	430	WDHA sintomatico
2	3776	>2000	
2A	4672	1700	
2B	352	225	post-resezione con diarrea
II. VIPoma			
1	368*	960	
1A	184	290	post-resezione
2	1152	1200	metastatico
3	304	290	metastatico dopo resezione
4	208	230	post-resezione
III. Diarrea acquosa senza diagnosi documentata			
1	11250	>14500	
2	368	185	
3	928	880	esplorazione neg.
IV. Diarrea acquosa con altri tumori			
1	192	390	ipernefroma
2	2360	1500	carcinoma a piccole cellule
3	208	330	ipernefroma con vasodilatazione
4	272	360	feocromocitoma
V. Pazienti normali			
1	64	<50	
2	96	<50	
3	104	<50	
4	96	<50	
5	176	110	
VI. Non noto			
1	720	1150	
2	512	1200	
3	320	170	

* L'analisi DiaSorin è stata eseguita dopo diversi congelamenti e scongelamenti.

** Analisi di regressione escludendo <50 coppie; $y = 0.79x + 335$; $r = 0.94$;
 y = DiaSorin VIP; x = Ohio State VIP

15. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PERFORMANCE

15.1 Precisione

Variazione intra-analisi (valori = 5)

Numero campione	Valore medio	D.S.	(% C.V.)
BASSO	62,6	1,2	1,9
ALTO	87,8	2,6	3,0

Variazione intra-analisi (valori = 73)

Numero campione	Valore medio	D.S.	(% C.V.)
BASSO	56,3	5,4	9,58
ALTO	80,4	5,7	7,07

15.2 ACCURATEZZA: L'ACCURATEZZA DELL'ANALISI È STATA CONTROLLATA MEDIANTE TEST DI DILUIZIONE E TEST DI RECUPERO.

Linearità (Parallelismo)

Studio di diluizione seriale di cinque campioni (Valori = pg/mL)

Numero campione	1/8	1/16	1/32
1	1584	1696	1888
2	3040	4192	4672
3	>3200	3440	3776
	1/10	1/15	1/20
4	2630	2130	2360
	1/100	1/150	1/200
5	7200	11250	10400

Recupero (Attendibilità) (Valori = pg/mL)

TABELLA V

Recuperi di VIP a diversi livelli approssimanti il range normale da plasma fresco contenente EDTA e aprotinina (ogni punto è la media delle analisi in duplice serie)

Cam- pione di plasma	VIP aggiunto (pg/mL)	VIP rilevato (pg/mL)	% di recupero	Cam- pione di plasma/ VIP	VIP aggiunto (pg/mL)	VIP rilevato (pg/mL)	% di recupero
1	0	14	--	3	0	14	--
	25	38	97		25	33	85
	50	50	78		50	48	75
	100	85	75		100	86	75
2	0	2	--	4	0	14	--
	25	23	85		25	38	90
	50	48	92		50	50	75
	100	80	78		100	80	68
			Recupe- ro medio	25	89%		
				50	80%		
				100	74%		

15.3 Sensibilità analitica

La quantità minima rilevabile, se definita come concentrazione apparente a tre deviazioni standard dai conteggi a legame massimo, è di 1,0 pg/provetta (5 pg/mL).

15.4 Specificità analitica

Il confronto della reattività incrociata dell'anticorpo VIP è stato eseguito con i seguenti peptidi:

Peptidi	% di reattività incrociata
Somatostatina	<0,1
pMotilina	<0,1
p-Polipeptide inibitorio gastrico (GIP)	<0,1
Glucagone	<0,1
p-Peptide di rilascio gastrina (GRP)	<0,1
Gastrina ¹²⁵ I	<0,1
Gastrina ³⁴ I	<0,1
pSecretina	<0,1
hPolipeptide pancreatico (PPP)	<0,1
hProinsulina	<0,1
pInsulina	<0,1
Colecistochinina (CCK8)	<0,1
Sostanza P	<0,1
Neurotensina	<0,1
Met-enkefalina	<0,1
Leu-enkefalina	<0,1
Bombesina	<0,1

FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA PER LA BIBLIOGRAFIA

SCHEMA DI ANALISI

1. **ATTENZIONE:** Preparare l'analisi su ghiaccio tritato. Il VIP è labile nel plasma se conservato a temperatura ambiente; pertanto, questa precauzione è necessaria per ottenere risultati validi
2. Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciar scongelare completamente eventuali campioni congelati. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 25°C. Contrassegnare due serie di provette.
3. Versare il reagente seguendo lo schema seguente:

Provette/Reagenti	Conteggi totali	NSB	CAL 0-5	Controlli e campioni non noti
Tampone citrato VIP	-	100 µL	200 µL	-
Calibratori (0-5)	-	200 µL	200 µL	-
Controlli	-	-	-	200 µL
Campioni non noti	-	-	-	200 µL
Antisiero			100 µL	100 µL

4. Coprire le provette con pellicola e agitare lentamente nel Vortex.
5. Lasciare in incubazione per 24 ore +/- 2 ore a 2-8°C.
6. Versare 100 µL di tracciante in tutti i pozzetti.
7. Coprire e agitare lentamente nel Vortex.
8. Lasciare in incubazione per 24 ore +/- 2 ore a 2-8°C.
9. Versare 1 mL di soluzione salina allo 0,85% in tutti i pozzetti, eccetto le provette per il conteggio totale.
10. Versare 500 µL di GAR-PPT nei pozzetti, eccetto nelle provette per il conteggio totale.
11. Coprire le provette e agitare lentamente nel Vortex.
12. Lasciare in incubazione per 2 ore +/- 15 minuti a 2-8°C.
13. Centrifugare a 760 x g* per 20 minuti.
14. Far decantare i liquidi superficiali.
15. Contare ogni provetta in un contatore a raggi gamma per 60 secondi o più.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$$

RADIOIMUNOENSAIO DE PEPTÍDEO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)

1. USO INDICADO

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

Este kit está indicado para a determinação quantitativa do peptídeo intestinal vasoactivo (VIP) no plasma através de um radioimunoensaio (RIA).

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

O VIP é um composto de 28 aminoácidos originariamente extraído do intestino delgado do porco.^{1,2} A sua sequência de aminoácidos, quando comparada com vários peptídeos relacionados, é a seguinte:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
VIP	His-	Ser-	Asp-	Ala-	Val-	Phe-	Thr-	Asp-	Asn-	Tyr-	Tyr-	Arg-	Leu-	Arg
Secretina	His-	Ser-	Asp-	Gly-	Thr-	Phe-	Thr-	Ser-	Glu-	Leu-	Ser-	Arg-	Leu-	Arg
Glucagon	His-	Ser-	Gln-	Gly-	Thr-	Phe-	Thr-	Ser-	Asp-	Tyr-	Ser-	Lys-	Tyr-	Leu
GIP	Tyr-	Ala-	Gln-	Gly-	Thr-	Phe-	Ile-	Ser-	Asp-	Tyr-	Ser-	Lys-	Ala-	Met

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
VIP	Lys-	Gln-	Met-	Ala-	Val-	Lys-	Lys-	Tyr-	Leu-	Asn-	Ser-	Ile-	Leu-	Asn (NH ₂)
Secretina	Asp-	Ser-	Ala-	Arg-	Leu-	Gln-	Asp-	Leu-	Leu-	Gln-	Gly-	Leu-	Val	
Glucagon	Asp-	Ser-	Arg-	Arg-	Ala-	Gln-	Asp-	Phe-	Val-	Gln-	Trp-	Leu-	Met-	Asn-Thr
GIP	Asp-	Lys-	Ile-	Arg-	Gln-	Gln-	Asp-	Phe-	Val-	Asn-	Trp-	Leu-	Leu-	Ala-etc.

Existem semelhanças entre a região amino-terminal do VIP e as regiões amino-terminais da secretina, do glucagon e do polipeptídeo gástrico inibitório (GIP). A região carboxi-terminal (i.e., resíduos 15-28) é, no entanto, bastante diferente.

O VIP ocorre de forma bastante abrangente em todo o tracto gastrointestinal, onde, segundo Bloom e Polak, as concentrações de tecidos de VIP são mais elevadas do que de qualquer outro peptídeo intestinal.³ Os efeitos periféricos do VIP nos intestinos incluem: aumento do fluxo alcalino de suco pancreático,¹ inibição da produção de ácido gástrico,^{4,5} estimulação da libertação de insulina,⁶ hiperglicémia como resultado da glicogenólise,⁷ estimulação do fluxo do suco do intestino delgado e aumento do conteúdo de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) nos intestinos.^{8,9}

Encontram-se também concentrações elevadas de VIP no sistema nervoso central, sobre o qual tem fortes efeitos vasodilatadores e hipotensivos, no sistema cardiovascular e no sistema respiratório, onde influencia a bronquodilatação e aumenta a ventilação.¹⁰ O VIP está localizado nos neurónios e nas células endócrinas, embora de forma mais predominante nos primeiros, e parece ser libertado através da estimulação neuronal.¹⁰⁻¹⁴

A medição do VIP é utilizada para pesquisar determinados tipos de tumores das ilhotas pancreáticas que segregam quantidades excessivas do peptídeo. Esta patologia, designada por síndrome de Verner-Morrison,¹⁵ caracteriza-se por diarreia aquosa refractária, hipocalemia e acloridria (síndrome de WDHA). Os indivíduos com esta síndrome apresentam níveis muito elevados de VIP no plasma, frequentemente milhares de vezes acima da concentração normal.¹⁶⁻¹⁸ Outra forma de diarreia, que se manifesta através de sintomas muito semelhantes aos da síndrome de Verner-Morrison, é o resultado da hiperplasia das ilhotas. No entanto, contrariamente à síndrome de Verner-Morrison, esta patologia caracteriza-se por níveis normais de VIP; estes casos foram designados por Bloom e Polak como pseudo-síndrome de Verner-Morrison.^{3,19} Os tumores, para além dos tumores das ilhotas, que produzem níveis elevados de VIP incluem: ganglioneuroblastoma, carcinoma bronquiogénico, feocromocitoma, carcinoma medular da tiróide e histiocitoma retroperitoneal.^{15,21-23}

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O VIP é medido através de um radioimunoensaio mediante a adição retardada de traçador para aumentar a sensibilidade. Adiciona-se a amostra e um anticorpo de coelho anti-VIP, após o que se efectua uma incubação de 24 horas a 2-8°C. Adiciona-se, então, o VIP ¹²⁵I, após o que se segue uma segunda incubação durante 24 horas a 2-8°C. Num único passo, adicionam-se um transportador pré-precipitado, um segundo anticorpo e polietileno glicol. O ensaio pode ser centrifugado e decantado, no mínimo, após 2 horas de incubação a 2-8°C.

4. REAGENTES FORNECIDOS NO KIT

Tampão Citrato VIP	1 frasco/2 mL
Calibrador 0 VIP	1 frasco/5 mL
Calibradores VIP (0-5)	5 frascos/2 mL
Anti-soro VIP	1 frasco/12,5 mL
VIP ¹²⁵ I	1 frasco/12,5 mL
Complexo de precipitação (GAR-PPT)	1 frasco/35 mL
Controlos do VIP (Nível 1 e 2)	2 frascos/2 mL
Número de testes	125

ARMAZENAMENTO: Aquando da recepção, e antes da reconstituição, conserve todos os reagentes a 2-8°C. Após a reconstituição, conserve todos os reagentes a -15° ou a uma temperatura inferior até ao prazo de validade indicado no rótulo. Os reagentes não devem ser usados após o prazo de validade.

Ao reconstituir o conteúdo dos frascos, agite delicadamente para evitar a formação de espuma. Não misture reagentes de lotes diferentes.

4.1 Tampão Citrato VIP: reagente liofilizado

O tampão citrato-BSA contém timerosal como conservante. Reconstitua o frasco com 2 mL de água purificada, agite e deixe assentar durante 15-20 minutos até que o conteúdo se dissolva completamente; agite devidamente antes da utilização.

4.2 Calibrador 0 VIP: reagente liofilizado

O plasma citratado é diluído em tampão citrato-BSA, o qual contém timerosal e outros estabilizadores. Reconstitua o frasco com 5 mL de água purificada, agite e deixe assentar durante 15-20 minutos até que o conteúdo se dissolva completamente; agite devidamente antes da utilização.

4.3 Calibradores VIP: reagente liofilizado

Os calibradores VIP são pré-diluídos em plasma sem VIP e em tampão citrato-BSA com concentrações nominais compreendidas entre 25 e 400 pg/mL. Os valores exactos das concentrações são atribuídos consoante cada lote. Reconstitua cada frasco com 2,0 mL de água purificada, agite e deixe assentar durante 15-20 minutos até que o conteúdo se dissolva completamente; agite devidamente antes da utilização. Este kit foi standardizado com VIP Sintético. O calibrador demonstra permutabilidade com amostras do paciente quando usado com reagentes e um procedimento operacional deste teste de diagnóstico *in vitro* tal como recomendado.

4.4 Anti-soro VIP: reagente liofilizado

O soro de coelho anti-VIP é diluído em tampão borato-BSA com timerosal. Reconstitua o frasco com 12,5 mL de água purificada, agite e deixe assentar durante 15-20 minutos até que o conteúdo se dissolva completamente; agite devidamente antes da utilização.

4.5 VIP ¹²⁵I: reagente liofilizado

O VIP é marcado com iodo ¹²⁵I e diluído em tampão BSA-citrato-EDTA com timerosal e outros estabilizadores. Reconstitua o frasco com 12,5 mL de água purificada, agite e deixe assentar durante 15-20 minutos até que o conteúdo se dissolva completamente; agite devidamente antes da utilização.

4.6 Complexo de precipitação (GAR-PPT): reagente liofilizado

O soro de coelho normal, pré-precipitado com soro de cabra anti-coelho e polietileno glicol (PEG), é diluído em tampão borato-BSA com timerosal e outros conservantes.

Reconstitua cada frasco com 35 mL de água purificada; agite devidamente até a suspensão ficar homogênea e, de seguida, deixe assentar durante pelo menos 30 minutos à temperatura ambiente, agitando ocasionalmente.

4.7 Controlo VIP (nível 1 e nível 2): reagente liofilizado

O plasma humano desfibrinado é artificialmente contaminado, se necessário, com a quantidade adequada de VIP para se obter uma concentração dentro de um determinado intervalo. É adicionada azida de sódio como conservante. Reconstitua cada frasco com 2,0 mL de água purificada, agite e deixe assentar durante 15-20 minutos até que o conteúdo se dissolva completamente.

5. AVISOS E PRECAUÇÕES

APENAS PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

Não recomendado para o uso interno ou externo em seres humanos ou animais.

REAGENTES COM MATERIAL DE ORIGEM HUMANA

Trate como se fossem potencialmente infecciosos.

Cada unidade de doador de soro/plasma usada na preparação deste produto foi testada por um método aprovado pela FDA e determinada como sendo não reactiva no que diz respeito à presença de HBsAg, anticorpos anti-HCV e anticorpos anti-HIV 1/2. Embora estes métodos sejam bastante precisos, não garantem que todas as unidades infectadas sejam detectadas. Este produto também pode conter outros materiais de origem humana para os quais não há teste aprovado. Como nenhum método de teste conhecido pode oferecer segurança total no que concerne à ausência do vírus da hepatite B (HBV), do vírus da hepatite C (HCV), do vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) ou de outros agentes infecciosos, todos os produtos que contêm materiais de origem humana devem ser manuseados de acordo com as boas práticas laboratoriais, adoptando as precauções adequadas tal como descrito no Manual dos Centros Americanos para Controlo e Prevenção de Doenças e Institutos Nacionais de Saúde, "Biosegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos" (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories), 4ª ed., Maio 1999 ou edição actual.

REAGENTES COM AZIDA DE SÓDIO

CUIDADO: Alguns reagentes deste kit contêm azida de sódio. A azida de sódio pode reagir com o chumbo ou cobre das canalizações e formar azidas de metal altamente explosivo. Elimine-a com grandes quantidades de água para evitar a acumulação de azida. Para mais informações, consulte "Descontaminação de tubos de pias de laboratórios para remover sais de azidas", no Manual Guia-Gestão de Segurança Nº CDC-22 emitido pelos Centros de Controlo e Prevenção de Doenças, Atlanta, GA, EUA 1976.

Frases de Risco de Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia (Directiva do Conselho 1999/45/EC)

R20/21/22 - Nocivo pela inalação, em contacto com a pele e se ingerido.

R32 - O contacto com ácidos liberta gás muito tóxico.

S28 - Após contacto com a pele, lave imediatamente com uma quantidade abundante de água.

REAGENTES COM TIMEROSAL

Alguns reagentes deste kit contêm timerosal, o qual inclui um composto de mercúrio. A eliminação do mercúrio elementar, do mercúrio inorgânico, dos óxidos de mercúrio e de compostos de mercúrio deve ser feita em conformidade com as normas locais e nacionais.

ADVERTÊNCIA: Este produto contém um elemento químico considerado pelo Estado da Califórnia como causador de deficiências congénitas ou de outras lesões reprodutivas.

REAGENTES COM IODO 125

Este kit contém material radioactivo que não excede 2 µCi (74 kBq) de iodo 125. Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e adoptadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseamento e eliminação deste material.

Para médicos ou instituições que recebem radioisótopos ao abrigo de uma licença geral:

Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática da medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínicos *in vitro* que não envolvam uma administração interna ou externa do material, ou da radiação resultante, em seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos ou do estado com o qual a Comissão tenha celebrado um acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve limitar-se a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve limitar-se apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo com a boca.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.
5. As áreas onde possam ocorrer derrames devem ser limpas e lavadas com um detergente alcalino ou uma solução de descontaminação radiológica. Qualquer material de vidro usado deve ser completamente enxaguado com água antes da lavagem com qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem radioisótopos ao abrigo de uma licença específica:

A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições da sua licença específica.

ADVERTÊNCIA: Este produto contém um elemento químico que provoca cancro, segundo o Estado da Califórnia.

ATENÇÃO: O símbolo de radioactividade impresso no folheto informativo da embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indica a quantidade real de radioactividade na data de calibragem enquanto o folheto informativo da embalagem indica a radioactividade teórica do kit.

6. INDICAÇÕES DE POSSÍVEL DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES DO KIT

- 6.1 A presença de partículas anormais em qualquer dos reagentes.
- 6.2 Um desvio na inclinação ou posição da curva de calibragem em relação à que é normalmente obtida.
- 6.3 Uma diminuição na ligação máxima.
- 6.4 Uma ligação não específica alta

7. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

São necessários duzentos microlitros, em duplicado, de plasma EDTA com Aprotinina para o ensaio VIP. As amostras de soro podem ser directamente analisadas, sem que seja necessária qualquer extracção.

A utilização de plasma com EDTA e Aprotinina é necessária na recolha inicial das amostras para o ensaio de VIP.

Recolha uma amostra de sangue num tubo de vidro vazio de 5 mL ou 10 mL, utilizando EDTA como anticoagulante. A aprotinina deve ser imediatamente adicionada ao tubo de recolha, para prevenir a degradação do VIP na amostra, numa concentração de 2,500 KIU/5 mL de sangue completo. Centrifugue imediatamente as amostras durante

15 minutos a $760 \times g^{**}$ para obter plasma sem hemólise. Separe o soro das células e coloque-o em tubos de conservação. Se não utilizar a amostra imediatamente, conserve-a a -15°C ou a uma temperatura inferior. Não congele e descongele repetidamente as amostras.

Qualquer plástico, vidro ou outro material que entrar em contacto com a amostra deve estar completamente descontaminado.

$^{**} g = (1118 \times 10^{-9}) (\text{raio em cm}) (\text{rpm})^2$

8. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- 8.1 Tubos de vidro descartáveis de borosilicato, 12 x 75 mm.
- 8.2 Centrifugadora com controlo da temperatura para tubos de 12 x 75 mm.
- 8.3 Contador de cintilação gama capaz de contar iodo 125.
- 8.4 Misturador tipo Vortex.
- 8.5 Dispositivos de pipetagem recomendados:
 - a. Micropipetadores calibrados para a administração de 100 µL e 200 µL.
 - b. Distribuidores de repetição calibrados para a administração de 100 µL, 500 µL e 1 mL.
- 8.6 Solução salina 0,85%.
- 8.7 Água purificada.

9. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

CUIDADO: PREPARE O ENSAIO SOBRE **GELO PICADO**. O VIP É LÁBIL NO PLASMA ARMAZENADO À TEMPERATURA AMBIENTE, PELO QUE É NECESSÁRIO ADOPTAR ESTA PRECAUÇÃO PARA OBTER RESULTADOS VÁLIDOS.

- 9.1 Reconstitua os reagentes liofilizados e deixe descongelar completamente quaisquer reagentes congelados. Não deixe os reagentes atingirem temperaturas superiores a 25°C. Agite delicadamente todos os reagentes antes de os utilizar.
- 9.2 Prepare tubos de vidro descartáveis de 12 x 75 mm, marcados em duplicado, de acordo com o Esquema do Ensaio da última página.
- 9.3 Adicione os reagentes da seguinte forma:
 - a. **Tubos de contagens totais**
Reserve até ao passo 5
 - b. **Tubos de ligação não específica (NSB)**
200 µL de Calibrador 0
100 µL de tampão citrato VIP
 - c. **Calibrador 0**
200 µL de Calibrador 0
100 µL de anti-soro VIP
 - d. **Calibradores VIP (A-E)**
200 µL de calibrador VIP
100 µL de anti-soro VIP
 - e. **Controlos e amostras desconhecidas**
200 µL de plasma
100 µL de anti-soro VIP
- 9.4 Agite delicadamente os tubos no misturador tipo Vortex, evitando a formação de espuma, e incube-os durante 24 horas (±2 horas) a 2-8°C.
- 9.5 Adicione 100 µL de VIP 125I a todos os tubos.
- 9.6 Agite delicadamente os tubos no misturador tipo Vortex, evitando a formação de espuma, e incube-os durante 24 horas (±2 horas) a 2-8°C.
- 9.7 Adicione 1 mL de solução salina 0,85% a todos os tubos, à excepção dos tubos de contagens totais.
- 9.8 Agite vigorosamente o GAR-PPT; adicione 500 µL a todos os tubos, à excepção dos tubos de contagens totais.
- 9.9 Agite delicadamente os tubos no misturador tipo Vortex, evitando a formação de espuma, e incube-os durante 2 horas (±15 minutos) a 2-8°C.
- 9.10 Centrifugue os tubos utilizando 760 x g* durante 20 minutos a 20-25°C.

$$** g = (1118 \times 10^{-6}) (\text{raio em cm}) (\text{rpm})^2$$

- 9.11** Decante imediatamente os sobrenadantes de todos os tubos, à excepção dos tubos de contagens totais, invertendo-os durante pelo menos 2 minutos. Seque os tubos com papel absorvente, para retirar quaisquer gotas de sobrenadante que tenham eventualmente ficado nos rebordos, antes de os colocar na posição vertical.
- 9.12** Utilizando um contador de cintilação gama, conte o precipitado de cada tubo e dos tubos de contagens totais durante 60 segundos ou mais (consulte a secção Limitações do Procedimento).

10. COMENTÁRIOS SOBRE O PROCEDIMENTO

- 10.1** Efectue o ensaio de todas as amostras em duplicado para garantir um elevado grau de confiança nos valores obtidos.
- 10.2** Adicione cada alíquota de reagente no terço inferior do tubo de ensaio de modo a garantir a mistura total dos reagentes.
- 10.3** Os tubos descartáveis de alguns fabricantes originam ligações não específicas elevadas.
- 10.4** Se optar por aspirar o sobrenadante do precipitado, tenha cuidado para não agitar o precipitado.
- 10.5** Qualquer valor superior ao do calibrador mais elevado deve ser diluído com calibrador 0 e novamente determinado. Corrija o resultado utilizando um factor de diluição adequado.
- 10.6** Controle a temperatura durante a fase de centrifugação para que ela não ultrapasse os 25°C.
- 10.7** Para monitorizar completamente o desempenho consistente de um ensaio RIA, devem verificar-se factores adicionais. A DiaSorin sugere a verificação dos parâmetros seguintes para assegurar um desempenho consistente do kit.
- a. Contagens totais**
 - b. Ligação máxima**
Média das contagens por minuto (CPM) dos Tubos do Calibrador 0/Média das CPM dos Tubos de Contagens Totais.
 - c. Ligação não específica**
Média das CPM dos Tubos NSB/Média das CPM dos Tubos de Contagens Totais.
 - d. Inclinação da curva do calibrador**
Por exemplo, monitorize os pontos de supressão 80, 50 e 20% da linha do calibrador.

11. CONTROLO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve incluir pelo menos dois controlos do kit em todos os ensaios para garantir a validade dos resultados de cada ensaio. Deve, então, determinar-se o desvio médio e o desvio padrão para cada controlo, utilizando no mínimo dez ensaios. Pode, então, obter-se um intervalo aceitável de valores para esses controlos utilizando ± 2 desvios padrão dos valores previamente determinados. O Laboratório de Controlo de Qualidade da DiaSorin determinou um intervalo para os controlos incluídos neste kit. Estes intervalos estão impressos nos frascos de controlo de qualidade.

12. CÁLCULO DE RESULTADOS

Existem vários métodos para calcular resultados de ensaios RIA. Cada um baseia-se na obtenção de uma curva de calibragem, desenhando a extensão da ligação versus as concentrações declaradas dos calibradores. Este gráfico pode ser em escala linear ou logarítmica. Cada um destes métodos dá essencialmente os mesmos valores para os controlos e amostras, embora alguns ensaios se possam "adequar" melhor do que outros a determinado método. O método de cálculo do Laboratório de Controlo de Qualidade da DiaSorin é %B/B₀ versus a concentração logarítmica.

12.1 Calcule a média das CPM para cada calibrador, controlo e amostra desconhecida.

12.2 Subtraia a média das CPM dos tubos NSB a todas as contagens.

12.3 Divida as CPM corrigidas de cada calibrador, controlo ou amostra pelas CPM corrigidas do calibrador 0.

$$\frac{B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM do calibrador ou amostra desconhecida} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM do calibrador 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

12.4 Utilizando papel milimétrico semi-logarítmico ou log-logit de dois ciclos, desenhe a percentagem de B/B₀ para os calibradores VIP (eixo vertical) versus a concentração (eixo horizontal).

12.5 Desenhe a linha de melhor ajuste através dos pontos.

12.6 Interpole os níveis de VIP nas amostras desconhecidas a partir do gráfico.

12.7 Se uma amostra desconhecida tiver sido diluída, corrija de acordo com o factor de diluição adequado.

12.8 Calcule a ligação máxima dividindo as CPM do calibrador 0 pela média de contagens totais obtida nos tubos de contagens totais.

TABELA III
Dados da amostra no ensaio RIA de VIP da DiaSorin

Tubo	CPM Duplicado	Média CPM	CPM Corrigidas	Percentagem		Conc. (pg/mL)
				Ligação (B/T)	Percentagem (B/B ₀)	
Contagens totais	10,928 10,931	10,930				
NSB	808 1,055	932		8.5		
Calibrador 0	4,603 4,834	4,709	3,777	43.1	100.0	
Calibradores (pg/mL)						
A (19)	4,034 4,058	4,046	3,114		82.5	
B (30)	3,542 3,573	3,558	2,626		69.5	
C (54)	2,768 2,766	2,767	1,835		48.8	
D (140)	1,948 2,028	1,988	1,056		28.0	
E (290)	1,297 1,408	1,352	420		11.1	
Amostras desconhecidas						
1	2,051 2,070	2,060	1,128		29.9	126
2	3,210 3,207	3,209	2,277		60.3	40

Os dados típicos da amostra e a curva de calibragem são apresentados na TABELA III e na FIGURA 1; esta informação serve apenas como referência e não deverá ser utilizada para o cálculo de qualquer valor.

CURVA DE CALIBRAGEM DA AMOSTRA DE VIP

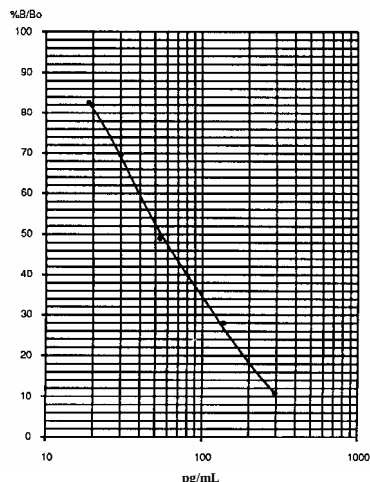


FIGURA 1

O Laboratório de controlo de qualidade da DiaSorin utiliza o método de curvas "spline".

13. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- 13.1 Se a concentração inicial da amostra desconhecida for superior à do calibrador mais alto, dilua apenas com o Calibrador 0.
- 13.2 Não congele e descongele repetidamente as amostras.
- 13.3 Os tempos de contagem devem ser suficientes para prevenir os erros estatísticos (por exemplo, a acumulação de 2.000 CPM produzirá um erro de 5%; 10.000 CPM produzirão um erro de 1%).

14. VALORES DE REFERÊNCIA

INTERPRETAÇÃO CLÍNICA DOS VALORES

Recolheram-se amostras de quarenta e cinco pessoas normais em jejum (idade média de 28 anos) para a determinação do VIP no plasma. Em 21 indivíduos do sexo masculino, o valor foi de $42,8 \pm 11,9$ pg/mL de VIP (média $\pm$ desvio padrão) e em 24 indivíduos do sexo feminino, $42,6 \pm 7,2$ pg/mL. Uma vez que não há nenhuma diferença significativa entre os valores dos indivíduos do sexo masculino e feminino, a média global é de $42,7 \pm 9,5$ pg/mL em adultos em jejum. Um intervalo provisório para o desvio padrão seria 23-63 pg/mL. Este intervalo normal pode ser mais alargado se se utilizarem indivíduos de uma população hospitalar sem doença gastro-intestinal como grupo de controlo. Outros estudos indicam que o intervalo normal ascende a 200 pg/mL. O intervalo normal do ensaio efectuado na Universidade Estatal de Ohio é não detectável até 170 pg/mL, com uma média de 62 ± 44 pg/mL. Uma vez que o ensaio da Universidade Estatal de Ohio reporta os valores inferiores a 50 como não detectáveis, o seu ensaio não é tão sensível como o procedimento da DiaSorin.

O Dr. Thomas O'Dorisio da Universidade Estatal de Ohio recolheu uma série de amostras clínicas resultantes de um ensaio duplo-cego*, as quais incluíam vários VIPomas e ganglioneuroblastomas. Posteriormente, ele revelou os resultados obtidos com essas mesmas amostras; eles são apresentados na TABELA IV. Os dados demonstram muitos valores de VIP extremamente elevados, os quais são característicos dos tumores produtores de VIP, e demonstram que o kit VIP da DiaSorin mede, de facto, os valores elevados nos humanos, sendo perfeitamente comparável a um laboratório de pesquisa estabelecido. A equação de regressão para as primeiras 22 amostras (excluindo as 4 normais com níveis não detectáveis referidos pela Universidade Estatal de Ohio) é $y = 0,78x + 32$, sendo que y é o valor da DiaSorin e x é o valor da Universidade Estatal de Ohio. O coeficiente de correlação é 0,94. As amostras de controlo utilizadas no laboratório da Universidade Estatal de Ohio foram igualmente medidas com o kit da DiaSorin. O seu controlo baixo (intervalo da Universidade Estatal de Ohio <50-100 pg/mL) tinha um valor médio de 53 pg/mL e o controlo alto (intervalo da Universidade Estatal de Ohio 450-1014 pg/mL) foi determinado como sendo 1077 pg/mL em 3 análises separadas efectuadas com o kit da DiaSorin. Várias destas amostras da Universidade Estatal de Ohio obtidas a partir de indivíduos normais tinham valores compreendidos entre 65 e 176 pg/mL no ensaio da DiaSorin. A vasta gama de amostras patológicas na síndrome de WDHA é típica da literatura e bastante semelhante à situação dos níveis de gastrina no gastrinoma.

* Estas amostras tinham sido conservadas no laboratório do Dr. O'Dorisio durante um espaço de tempo desconhecido. Desconhece-se o número de congelações e descongelações efectuadas entre a análise da Universidade e a nossa própria análise.

TABELA IV
Resultados das amostras desdobradas do ensaio duplo-cego do
Dr. Thomas O'Dorisio da Universidade Estatal de Ohio
Valores: picogramas/mL

Caso	VIP DiaSorin	VIP Universidade Ohio	Comentários
I. Ganglioneuroblastoma			
1	1888	1700	WDHA sintomática
1A	248	135	assintomática
1B	464	430	WDHA sintomática
2	3776	>2000	
2A	4672	1700	
2B	352	225	pós-ressecção com diarreia
II. VIPoma			
1	368*	960	
1A	184	290	pós-ressecção
2	1152	1200	metastática
3	304	290	metastática após ressecção
4	208	230	pós-ressecção
III. Diarreia aquosa sem diagnóstico documentado			
1	11250	>14500	
2	368	185	
3	928	880	exploração neg.
IV. Diarreia aquosa com outros tumores			
1	192	390	hipernefoma
2	2360	1500	carcinoma de células pequenas
3	208	330	hipernefoma com vasodilatação
4	272	360	feocromocitoma
V. Pacientes normais			
1	64	<50	
2	96	<50	
3	104	<50	
4	96	<50	
5	176	110	
VI. Desconhecidos			
1	720	1150	
2	512	1200	
3	320	170	

* O ensaio da DiaSorin foi efectuado após várias congelações e descongelações.

** A análise da regressão exclui os pares <50; $y = 0,79x + 335$; $r = 0,94$;
 y = VIP DiaSorin; x = VIP Universidade Ohio

15. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

15.1 Precisão

Variação intra-ensaio (valores = 5)

Número da amostra	Valor médio	S.D	%C.V.
Baixo	62,6	1,2	1,9
Alto	87,8	2,6	3,0

Variação inter-ensaio (valores = 73)

Número da amostra	Valor médio	S.D	%C.V.
Baixo	56,3	5,4	9,58
Alto	80,4	5,7	7,07

15.2 VERACIDADE: A VERACIDADE DO ENSAIO FOI VERIFICADA ATRAVÉS DO TESTE DE DILUIÇÃO E DO TESTE DE RECUPERAÇÃO.

Linearidade (Paralelismo)

Estudo de diluição em série de cinco amostras de pacientes (Valores = pg/mL)

Número da amostra	1/8	1/16	1/32
1	1584	1696	1888
2	3040	4192	4672
3	>3200	3440	3776
	1/10	1/15	1/20
4	2630	2130	2360
	1/100	1/150	1/200
5	7200	11250	10400

Recuperação (Exactidão) (Valores = pg/mL)

TABELA V

Recuperações do VIP a vários níveis aproximando-se do intervalo normal utilizando plasma fresco com EDTA e Aprotinina
(Cada ponto é a média das análises em duplicado)

Amostr a de plasma	VIP adicio- nado (pg/mL)	VIP encon- trado (pg/mL)	% Recu- peração	VIP Amostra de plasma	VIP adicionado (pg/mL)	VIP encon- trado (pg/mL)	% Recupe- ração
1	0 25 50 100	14 38 50 85	-- 97 78 75	3	0 25 50 100	14 33 48 86	-- 85 75 75
2	0 25 50 100	2 23 48 80	-- 85 92 78	4	0 25 50 100	14 38 50 80	-- 90 75 68
			Recu- peração média	25 50 100	89% 80% 74%		

15.3 Sensibilidade analítica

Quando definida como a concentração aparente em 3 desvios padrão das contagens na ligação máxima, a quantidade mínima detectável é de 1,0 pg/tubo (5 pg/mL).

15.4 Especificidade analítica

A comparação da reatividade cruzada do anticorpo anti-VIP foi feita com os seguintes peptídeos:

Peptídeos	% Reactividade cruzada
Somatostatina	<0,1
pMotilina	<0,1
pPolipeptídeo inibitório de gastrina (GIP)	<0,1
Glucagon	<0,1
pPeptídeo de liberação de gastrina (GRP)	<0,1
Gastrina ¹²⁵ I	<0,1
Gastrina ³⁴ I	<0,1
pSecretina	<0,1
hPolipeptídeo Pancreático (PPP)	<0,1
hProinsulina	<0,1
pInsulina	<0,1
Colecistoquinina (CCK8)	<0,1
Substância P	<0,1
Neurotensina	<0,1
Metionina Encefalina	<0,1
Leucina Encefalina	<0,1
Bombesina	<0,1

CONSULTE A ÚLTIMA PÁGINA PARA OBTER REFERÊNCIAS

ESQUEMA DO ENSAIO

1. CUIDADO: Prepare o ensaio sobre gelo picado. O VIP é lábil no plasma armazenado à temperatura ambiente, pelo que é necessário adoptar esta precaução para obter resultados válidos.
2. Reconstitua os reagentes liofilizados e deixe descongelar totalmente qualquer amostra congelada. Não permita que os reagentes atinjam temperaturas superiores a 25°C. Identifique os tubos em duplicado.
3. Distribua os reagentes de acordo com o esquema seguinte:

Tubos/Reagentes	Conta-gens totais	NSB	Cal 0-5	Controlos e amostras desconhecidas
Tampão Citrato VIP	-	100 µL	200 µL	-
Calibradores (0-5)	-	200 µL	200 µL	-
Controlos	-	-	-	200 µL
Amostras desconhecidas	-	-	-	200 µL
Anti-soro	-	-	100 µL	100 µL

4. Tape os tubos com parafilme e agite-os delicadamente num misturador tipo Vortex.
5. Incube durante 24 horas +/- 2 horas a 2-8°C.
6. Deite 100 µL de traçador em todos os poços.
7. Tape e agite delicadamente num misturador tipo Vortex.
8. Incube durante 24 horas +/- 2 horas a 2-8°C.
9. Deite 1mL de solução salina 0,85% em todos os poços, à excepção dos tubos de contagens totais.
10. Deite 500 µL de GAR-PPT em todos os poços, à excepção dos tubos de contagens totais.
11. Tape os tubos e agite-os delicadamente num misturador tipo Vortex.
12. Incube durante 2 horas +/- 15 minutos a 2-8°C.
13. Centrifugue utilizando 760 x g* durante 20 minutos.
14. Decante os sobrenadantes.
15. Conte cada tubo num contador gama durante 60 segundos ou mais.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raio em cm}) (\text{rpm})^2$$

REFERENCES/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFIA/REFERÊNCIAS

1. Said, S.I. and V. Mutt, "Isolation from Porcine-Intestinal Wall of a Vasoactive Octa-cosapeptide Related to Secretin and to Glucagon," **European Journal of Biochemistry**, 28:199, (1972).
2. Said, S.I. and V. Mutt, "Polypeptide with Broad Biological Activity: Isolation from Small Intestine," **Science**, 169:1217, (1970).
3. Bloom, S.R. and J.M. Polak, "VIP Measurement in Distinguishing Verner-Morrison Syndrome and Pseudo Verner-Morrison Syndrome," **Clinical Endocrinology**, 5:223, (1976).
4. Barbezat, G.O. and M.I. Grossman, "Intestinal Secretion: Stimulation by Peptides," **Science**, 174:422, (1971).
5. Makhoul, G.M. and S.I. Said, "The Effect of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) on Digestive and Hormonal Function," In **Gastrointestinal Hormones**, Ed. J.C. Thompson, Texas University Press, pp. 599-610, (1975).
6. Kerins, C. and S.I. Said, "Hyperglycemic and Glycogenolytic Effects of Vasoactive Intestinal Polypeptide," **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 142:1014, (1972).
7. Schebalin, M., S.I. Said and G.M. Makhoul, "Stimulation of Insulin and Glucagon Secretion by Vasoactive Intestinal Peptide," **American Journal of Physiology**, 232: 197, (1977).
8. Schwartz, C.J., D.V. Kimberg, H.E. Sheerin, M. Field and S.I. Said, "Vasoactive Intestinal Peptide Stimulation of Adenylate Cyclase and Active Electrolyte Secretion in Intestinal Mucosa," **Journal of Clinical Investigation**, 54:536, (1974).
9. Krejs, G.J., J.S. Fordtran, S.R. Bloom, J. Fahrenkrug and O.B. Schaffalitzky De Muckadell, "Effect of VIP Infusion on Water and Ion Transport in the Human Jejunum," **Gastroenterology**, 78:722, (1980).
10. Said, S.I., "Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP): Current Status," In **Gastrointestinal Hormones**, Ed. J.C. Thompson, Texas University Press, pp. 591-597, (1975).
11. Bryant, M.G., S.R. Bloom, J.M. Polak, R.H. Albuquerque, I. Modlin and A.G.E. Pearse, "Possible Dual Role for Vasoactive Intestinal Peptide as Gastrointestinal Hormone and Neurotransmitter Substance," **Lancet**, 1:991, (1976).
12. Domschke, S., W. Domschke, S.R. Bloom, P. Mitznegg, S.J. Mitchell, G. Lux and U. Strunz, "Vasoactive Intestinal Peptide in Man: Pharmacokinetics, Metabolic and Circulatory Effects," **Gut**, 19:1049, (1978).
13. Fahrenkrug, J., "Vasoactive Intestinal Polypeptide: Measurement, Distribution and Putative Neurotransmitter Function," **Digestion**, 19:149, (1979).
14. Uddman, R., J. Fahrenkrug, L. Malm, J. Alumets, R. Hakanson and F. Sundler, "Neuronal VIP in Salivary Glands: Distribution and Release," **Acta. Physiol. Scand.**, 110:31, (1980).
15. Verner, J.V. and A.B. Morrison, "Islet Cell Tumor and a Syndrome of Refractory Watery Diarrhea and Hypokalemia," **American Journal of Medicine**, 25:374, (1958).
16. Bloom, S.R. and J.M. Polak, "Glucagonomas, VIPomas and Somatostatinomas," **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, 9(2):285, (1980).
17. Modlin, I.M. and S.R. Bloom, "VIPomas and the Watery Diarrhea Syndrome," **South African Medical Journal**, 54:53, (1978).
18. Yamaguchi, K., K. Abe, S. Miyakawa, S. Ohnami, M. Sakagami and N. Yanaihara, "The Presence of Macromolecular Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) in VIP-Producing Tumors," **Gastroenterology**, 79(4), (1980).

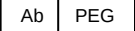
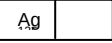
19. Kidd, G.S., M. Donowitz, T. O'Dorisio, S. Cataland and F. Newman, "Mild Chronic Watery Diarrhea-Hypokalemia Syndrome Associated with Pancreatic Islet Cell Hyper-plasia," **The American Journal of Medicine**, 66:883, (1979).
20. O'Dorisio, M.S., T.M. O'Dorisio, S. Cataland and S.P. Balcerzak, "Vasoactive Intestinal Polypeptide as a Biochemical Marker of Polymorphonuclear Leukocytes," **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, 96(4):666, (1980).
21. Kaplan, S.J., C.T. Holbrook, H.G. McDaniel, W.L. Buntain and W.M. Crist, "Vasoactive Intestinal Peptide Secreting Tumors of Childhood," **American Journal Diseases of Child.**, 134:21, (1980).
22. Iida, Y., O. Nose, H. Kai, A. Okada, T. Mori, P. Lee, K. Kakudo and N. Yanaihara, "Watery Diarrhea with a Vasoactive Intestinal Peptide-producing Ganglioneuroblastoma," **Archives of Disease in Childhood**, 55:929, (1980).
23. Sagor, G.R., M.G. Bryant, M.A. Ghatei, R.M. Kirk and S.R. Bloom, "Release of Vasoactive Intestinal Peptide in the Dumping Syndrome," **British Medical Journal**, 282:507, (1981).

SYMBOLS USED WITH DEVICES

	English	Français	Deutsch	Italiano
	European Conformity	Conformité aux normes européennes	CE – Konformitätskennzeichnung	Conformità europea
	Expiration Date	Date limite d'utilisation	Mindesthaltbarkeitsdatum	Data di scadenza
	Manufacturer	Fabricant	Hersteller	Fabbricante
	Consult Instructions for Use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanweisung beachten	Consultare le istruzioni per l'uso
	Maximum temperature	Température maximale	Höchsttemperatur	Temperatura massima
IVD	In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnostica in vitro.
LOT	Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	Lotto n°
Ab	Antiserum	Antisérum	Antiserum	Antisiero
Ab PEG	Precipitating reagent	Réactif précipitant	Fällungsreagenz	Reagente precipitante
Ag	Tracer: antigen labelled with ¹²⁵ I	Traceur : antigène marqué à l'iode ¹²⁵ I	Tracer: ¹²⁵ I-markiertes Antigen	Tracciatore: antigene etichettato con ¹²⁵ I
BUF	Buffer	Tampon	Puffer	Tampone
CAL	Calibrator	Étalon	Kalibrator	Calibratore
CONTROL	Control serum	Sérum de contrôle	Kontrollserum	Siero di controllo
	Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radioattivo
	Harmful	Nocif	Gesundheits-schädlich	Nocivo

SYMBOLS USED WITH DEVICES CONTINUED ON NEXT PAGE.

CONTINUED FROM PREVIOUS PAGE - SYMBOLS USED WITH DEVICES

	Português
	Conformidade com as normas europeias
	Prazo de validade
	Fabricante
	Consulte as instruções de utilização
	Temperatura máxima
	Diagnóstico in vitro.
	N.º do lote
	Anti-soro
	Precipitado no reagente
	Traçador: antígeno marcado com ¹²⁵ I
	Tampão
	Calibrador
	Soro de controlo
	Radioactivo
	Nocivo

Distribué Par :

DiaSorin S.A.
11, rue Georges Besse
92160 Antony, France



DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.

Phone: 651-439-9710
FAX: 651-779-7847

For Customer Service in the
U.S. and Canada Call Toll Free:
800-328-1482

In the United Kingdom Call:
44 118 9364200
FAX: 44 118 9792061

10403

27340
9/03

PRINTED IN U.S.A.

